Synthese von Phenothiazinderivaten mit UV-sensitiven Substituenten und ihre Reaktionen mit der Erythrozytenmembran

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Beate Wälde-Zeeb
aus Göppingen

1983

UNIV.
LIBRARY
BIRM.

Synthese von Phenothiazinderivaten mit UV-sensitiven Substituenten und ihre Reaktionen mit der Erythrozytenmembran

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Beate Wälde-Zeeb
aus Göppingen

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	24. November 1983
Dekan:	Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Forth
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. P. T. Ammon

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fachbereich Medizin bei Direktor Prof. Forth unter Leitung von Herrn Dr. D.B. Wildenauer in der Zeit von Januar 1980 bis Juni 1983 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Forth danke ich herzlich für Anregungen und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr.H.P.T. Ammon danke ich für sein Interesse, wodurch es mir ermöglicht wurde, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Dr. D.B. Wildenauer bin ich besonders dankbar für die stete Hilfe, für viele Ratschläge und zahlreiche kritische Diskussionen.

Frau Schild danke ich für die Aufnahmen der NMR-Spektren.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1- 5
B.	Problemstellung	6- 7
C.	Ergebnisse	8-46
a:	Synthese	
1:	Synthese von photoreaktiven Phenothiazinderivaten	8-11
2.	Syntheseweg zur Herstellung von radioaktiv markiertem 2-Trifluormethyl-7-azidopromazin	12
3.	Synthese von Phenothiazinderivaten, die in Position 10 mit einer Piperazinyl-propylseitenkette substituiert sind	13
b:	Photochemisches Verhalten der Phenothiazine	14-15
c:	Biologische Versuche	16-46
1:	Charakterisierung der Phenothiazin-derivate	16
1.1.	Auswirkungen auf die osmotische Resistenz von Erythrozyten	16-19
1.2.	Einfluß auf die Erythrozytengestalt	20-23
2.	Photoaffinitätsmarkierung von Erythrozyten mit Chlorpromazin	23-26
3.	Photoreaktion von Fluphenazin-7-azid und Triflupromazin-7-azido-methojodid mit intakten Erythrozyten	27-29
3.1.	Analyse der Bindungsstellen in der Erythrozytenmembran	30-33

		Seite
3.2.	Untersuchung der Reaktion von Phenothiazinaziden mit Bestandteilen des Hämolysates	34-36
4.	Photoreaktion von 7-N_3- Fluphenazin und 7-N_3-Triflupromazin-methojodid mit isolierten Erythrozytenmembranen ("ghosts")	37-38
4.1.	Analyse der Bindungsstellen in den "ghosts"	39
5.	Photoreaktionen von Fluphenazinphenylazid mit intakten Erythrozyten und "ghosts"	40-43
5.1.	Analyse der Bindungsstellen	44-45
D.	Diskussion	46-58
E.	Experimenteller Teil	59-83
E.1.	Geräte und Material	59
E.1.1.	Geräte	59
E.1.2.	Material	60
E.2.	Erythrozyten	61
E.3.	Ghostpräparation	61
E.4.	Proteingehalt	61-62
E.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	62-66
E.5.1.	Herstellung der Gele	62
E.5.1.1.	Trenngel	62
E.5.1.2.	Sammelgel	63
E.5.2.	Präparation der Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
E.5.3.	Fixieren der Gele	64

		Seite
E.5.4.	Färben der Gele mit Coomassie Blue	64
E.5.5.	Entfärben der Gele	64
E.5.6.	Trocknen der Gele	64
E.5.7.	Färben der Gele mit Schiffs Reagens	64
E.5.8.	Autoradiographie	65
E.5.9.	Bestimmung der Radioaktivität	65
E.5.10.	Densitometrische Auswertung	66
E.6.	Gestaltänderung von Erythrozyten	66
E.7.	Bestimmung der osmotischen Resistenz	66-67
E.7.1.	Bestimmung der Natriumchloridkonzentration, die 50% Hämolyse verursacht	66-67
E.7.2.	Bestimmung der relativen Hämolyserate	67
E.8.	Photolyseversuche	67-68
E.8.1.	Intakte Erythrozyten	67-68
E.8.2.	Isolierte Erythrozytenmembranen "ghosts"	68-69
E.9.	Lipidextraktion der Erythrozyten nach Rose und Ohlander	69
E.9.1.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	70
E.9.2.	Detektion der Lipide auf der Kieselgelplatte	70
E.10.	Synthesen	71-83
F.	Zusammenfassung	84-86
G.	Literaturverzeichnis	87-104
H.	Lebenslauf	105

Abkürzungen

C.B. :	Coomassie Brillant Blue
DC :	Dünnschichtchromatographie
DMF :	Dimethylformamid
EDTA :	Äthylendiamintetraacetat
GP :	Glycoprotein
HB :	Hämoglobin
HK :	Hämatokrit
PAGE :	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS :	Puffer (150 mM NaCl; 5 mM Phosphat; pH7.4) "phosphat buffered saline"
PL :	Phospholipide
5P8 :	5 mM Phosphat; pH8.0
SDS :	Natriumdodecylsulfat
Temed:	Tetramethyläthylendiamin
Tris-HCl:	Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid

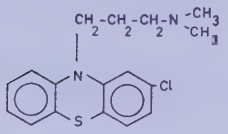
Proteine der Erythrozytenmembran (s. Abb.27, S.47):

1,2	=	Spektrin
3	=	"Bande 3", Anionentransportprotein
PAS	=	Glycophorin ("perjodic acid staining")
4.1/4.2	=	nicht näher charakterisiert
5	=	Aktin
6	=	Glyzeraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
7	=	nicht näher charakterisiert

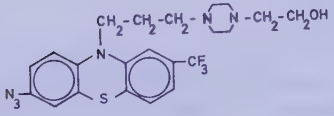
Zur Nomenklatur der verwendeten Substanzen:

Zwecks Vereinfachung der chemischen Bezeichnungen der Phenothiazinderivate wurden zusätzliche Substituenten an die internationale Kurzbezeichnung angehängt.

1) Phenothiazinderivate mit tertiärem Stickstoffatom werden vereinfacht als tertiäre Derivate bezeichnet:

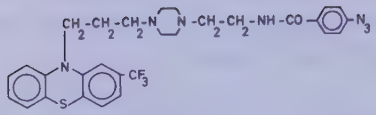


2-Chloro-10-(3-dimethylaminopropyl)phenothiazin=
Chlorpromazin (CPZ)



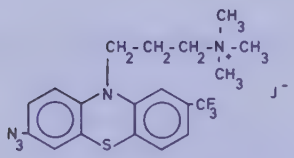
2-trifluormethyl-7-azido-10-(3-(4-(2-hydroxyethyl)-
1-piperazinyl)propyl)phenothiazin=
Fluphenazinazid

UNIV. LIBRARY



2-Trifluormethyl-10-(4-phenylazido-4'-acetamido-1'-propyl) piperazinyl)-phenothiazin = Fluphenazin phenylazid.

2) Phenothiazinderivate mit quartärem Stickstoffatom werden vereinfacht als quartäre Derivate bezeichnet:

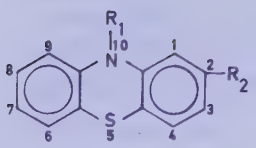


2-Trifluormethyl-7-azido-10-(3-dimethylaminopropyl) phenothiazin-methojodid = Triflupromazin-azid-methojodid (quartäres Triflupromazinazid, $7N_3$-TPZ CH_3J).

A. Einleitung

Die ersten Substanzen mit dem Phenothiazingrundgerüst wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts synthetisiert (1,93), aber erst mit der Synthese von Chlorpromazin 1952 durch Carpentier (2) und der Verwendung von Delay (3) zur Behandlung von Psychosen wurde ihre heutige Bedeutung erkannt. Die Folgen dieser Therapie waren, daß 1970, 15 Jahre nach ihrer Einführung in den U.S.A., die Anzahl der stationär behandelten, psychisch kranken Patienten auf die Hälfte zurückging (4). Trotz der weit verbreiteten Verwendung dieser Pharmaka ist über ihren molekularen Wirkungsmechanismus relativ wenig bekannt.

Das Phenothiazingrundgerüst (Abb.1) besteht aus einem Dreiringsystem, in dem zwei Benzolringe durch ein Schwefel- und ein Stickstoffatom miteinander verbunden sind (94). Die in der Therapie verwendeten Verbindungen sind in Position 2 mit einer elektronenziehenden Gruppe, am Stickstoff in Position 10 mit einer längeren Seitenkette substituiert (Abb.1).



R_1: a: $-CH_2-CH(CH_3)-N(R)(R)$

b: $-CH_2-CH_2-CH_2-N(R)(R)$

R= Alkylrest

R_2: H, Cl, $S-CH_3$, $O-CH_3$, CF_3

Abb.1: Grundtypen der Phenothiazinderivate

Die einzelnen Phenothiazinderivate unterscheiden sich qualitativ und quantitativ in ihrer pharmakologischen Wirkung (103). Neben ihren neuroleptischen Eigenschaften können Phenothiazine antihistaminisch, lokalanästhetisch und sedierend wirken (5).

Derivate mit Ethyl- oder Isopropylseitenketten (Abb.1) besitzen überwiegend periphere, Derivate mit n-Propylseitenketten überwiegend zentrale Wirkungen. Der Substituent in Position 2 (Abb.1) ist für die Wirkungsintensität verantwortlich (6). Durch Verlängerung der Seitenkette mit einem Piperazinring wird der antipsychotische Effekt verstärkt, der sedierende vermindert (7). Verbindungen mit quartärem Stickstoff in der Seitenkette (z.B. Thiazinamiummethylsulfat) wirken antihistaminisch und anticholinerg (7).

Die neuroleptische Wirkung der Phenothiazine wird als spezifisch bezeichnet, die lokalanästhetische und sedierende Wirkung als unspezifisch (8).
Spezifische Wirkungen treten im nanomolaren Konzentrationsbereich auf und werden auf eine Hemmung von Dopaminrezeptoren im Gehirn zurückgeführt (9). Unspezifische Wirkungen treten im mikromolaren Konzentrationsbereich auf und sind durch den lipophilen Charakter der Phenothiazine bedingt (10). Diese lipophilen Eigenschaften haben Wechselwirkungen mit den Membranen zur Folge, die die Phenothiazine mit den anderen Anästhetika gemeinsam haben und als Grundlage für Hypothesen der anästhetischen Wirkung dienen (104, 105).

Über den Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika ist bekannt, daß sie die Membranpermeabilität für Kationen, insbesondere für Natriumionen, herabsetzen. Eine verringerte Membranpermeabilität hat eine verminderte Erregbarkeit, beziehungsweise in

höheren Konzentrationen des Lokalanästhetikums, eine völlige Unerregbarkeit der Nervenfaser zur Folge.
Der molekulare Mechanismus dieser Blockade wird folgendermaßen erklärt:
Lokalanästhetika wirken an der Innenseite der Membran, sie müssen deshalb durch die Lipidschicht der Membran permeieren. Da die meisten Lokalanästhetika eine alicyclische oder aliphatische tertiäre Aminogruppe enthalten und in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen protonierter hydrophiler und nicht protonierter lipophiler Form vorliegt, ist die Lage des Gleichgewichts von großer Bedeutung. Die Lipidschranke der Membran kann nur vom nicht protonierten Anteil überwunden werden. Die protonierte Form des Lokalanästhetikums jedoch ist für die Wirkung am Wirkort selbst verantwortlich. Auf einer Erhöhung der positiven Ladungen im Membranbereich beruht die membranstabilisierende Wirkung, d.h. die Hemmung der Permeation von Na^+ und K^+ durch die Lokalanästhetika.
Phenothiazine zeigen lokalanästhetische Wirkungen, die therapeutisch nicht ausgenutzt werden, jedoch als Modell für anästhetische Wirkungen dienen können. Daraus ergibt sich die Frage über den Bindungsort der Phenothiazine in der Membran.

Membranwirkungen von Anästhetika und Tranquilizer können an erregbaren und nicht erregbaren Membranen festgestellt werden (11, 12).
Für in-vitro Studien werden deshalb Zellen verwendet, die in Struktur und Aufbau verhältnismäßig gut bekannt, sowie leicht zu isolieren sind, z.B. Erythrozyten (13-16).

Aus folgenden Gründen sind Erythrozyten sowohl für qualitative als auch für quantitative Untersuchungen brauchbar:

1. Konzentrationen der Anästhetika, die Erythrozyten vor Hämolyse schützen, sind im ähnlichen Bereich wie die Konzentrationen, die die Nerven blockieren (17, 23).

2. Höhere Konzentrationen schädigen irreversibel sowohl erregbare als auch nicht erregbare Membranen. Bei Erythrozyten tritt Hämolyse auf (15).

3. Der Membran/Puffer Verteilungskoeffizient von Anästhetika ist bei Erythrozyten und bei erregbaren Membranen ähnlich (24, 100).

4. Anästhetika expandieren sowohl Nerven- (25,26) als auch Erythrozytenmembrane (27,28,29).

Über die Wirkorte der Anästhetika in der Membran gibt es unterschiedliche Vorstellungen:

1. Anästhetisch wirksame Substanzen lösen sich in der Membran und rufen eine Ausdehnung der Membran und eine Erhöhung der Fluidität hervor (8).

2. Anästhetika reagieren mit den hydrophoben Seiten von Proteinen in der Membran und beeinträchtigen ihre Funktion (30).

3. Die unspezifischen Wirkungen kommen durch Wechselwirkungen mit der Membranaußenseite zustande (31,84).

Eine weitere Eigenschaft der Phenothiazine ist, daß sie in lokalanästhetisch wirksamen Konzentrationen bei Erythrozyten eine Gestaltänderung hervorrufen (45). Tertiäre Phenothiazinderivate z.B., verursachen Stomatozytenbildung, quartäre dagegen bewirken die Bildung von Echinozyten (Abb. 2).

STOMATOZYTEN DISCOZYTEN ECHINOZYTEN

Abb. 2: Gestaltänderung der Erythrozyten, hervorgerufen durch Phenothiazinderivate: tertiäre N-Verbindungen führen zur Ausbildung der Stomatozytenform, quartäre N-Verbindungen zur Echinozytenform.

Nach Sheetz und Singer (30) wird diese Gestaltänderung durch unterschiedliche Einlagerung in die innere bzw. äußere Hälfte der Lipiddoppelschicht verursacht:
Tertiäre Phenothiazine werden in die innere Hälfte eingelagert. Sie dehnen diese Seite dadurch aus und bilden Stomatozyten (Abb.3). Die Ausdehnung der äußeren Hälfte durch Einlagerung der quartären Verbindungen hat Echinozyten zur Folge (Abb.3).

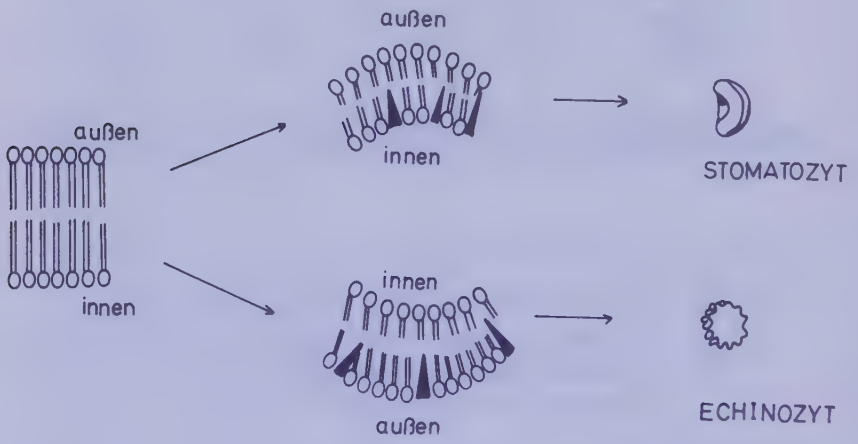


Abb.3: Zur Hypothese von Sheetz und Singer (30): Einlagerung amphiphiler Substanzen in die innere bzw. äußere Hälfte der Lipiddoppelschicht.

Diese Hypothese wurde von Conrad und Singer in Frage gestellt (31,84). Da sie keine Löslichkeit der Verbindungen in der Erythrozytenmembran feststellen konnten, nahmen diese Autoren eine Beeinflussung der Gestalt durch Wechselwirkungen mit der Membranaußenseite an.

B. Problemstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe chemischer bzw. photochemischer Methoden die Bindungsorte der Phenothiazine in der Erythrozytenmembran zu charakterisieren. Diese Fragestellung sollte mit Hilfe der "Photoaffinitätsmarkierung" [X]) bearbeitet werden (32-37). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß unter Lichtausschluß reversible Bindungsversuche durchgeführt werden können. Nach Aktivierung der Verbindungen mit Licht geeigneter Wellenlänge werden kovalente Bindungen erzeugt, die die Identifizierung und Charakterisierung der Bindungsstellen ermöglichen.

Phenothiazine sind lichtempfindlich. Es ist zum Beispiel bekannt, daß nach Chlorpromazingabe Photosensibilisierung auftreten kann (38). Es sollte daher untersucht werden, ob Chlorpromazin für Photoaffinitätsmarkierung geeignet ist. Nachteile der photochemischen Reaktion von Chlorpromazin sind jedoch lange Photolysezeiten und Ausbildung langlebiger Radikale (49,51,53). Um diese Nachteile zu umgehen, sollten Phenothiazinderivate, die einen photosensitiven Substituenten enthalten, synthetisiert werden. Ein dafür geeigneter Substituent ist die Azidgruppe, die bei Ultraviolettbestrahlung ein reaktives Nitren mit relativ kurzer Lebensdauer (0.1 - 1 ms) (39) bildet. Damit ist die Möglichkeit einer kovalenten Reaktion unmittelbar am Bindungsort gegeben.

X)
Die im Folgenden verwendete Bezeichnung "Photoaffinitätsmarkierung" ist eine wörtliche Übersetzung des im englischen Sprachgebrauch üblichen Begriffes "photoaffinity labeling".

Folgende Aufgaben sollten in dieser Arbeit durchgeführt werden:

1. Auswirkungen von Ultraviolettbestrahlung auf menschliche Erythrozyten, die mit Chlorpromazin behandelt worden waren.

2. Synthese von tertiären und quartären Phenothiazinderivaten mit einer Azidgruppe als "Photoaffinity Label".

3. Charakterisierung der synthetisierten Substanzen durch Bestimmung der Konzentrationen, die osmotische Resistenz und Gestalt von Erythrozyten beeinflussen.

4. Ausarbeitung der Photolysebedingungen.

5. Photoaffinitätsmarkierung von intakten Erythrozyten und von isolierten Membranen mit den synthetisierten Phenothiazinaziden.

6. Analyse der markierten Membranbestandteile mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

C. Ergebnisse

a: Synthese

1. Synthese von photoreaktiven Phenothiazinderivaten (Abb.4).

Als Ausgangsverbindung zur Darstellung der Azide diente 2- Trifluormethyl-7-nitrophenothiazin (V), das nach Florey und Restivo (40) hergestellt wurde: das Zinksalz von 2-Amino-4-trifluormethylbenzolthiol (II) (41) wurde mit 2,4-Dinitro-1-chlorbenzol zu 2- Amino-4-trifluormethyl-2',4'-dinitrodiphenylsulfid (III) umgesetzt. Das Formylderivat dieser Zwischenstufe (IV) wurde zu 7-Nitro-2-trifluormethylphenothiazin (V) zyklisiert ("smiles rearrangement") (Abb.5).

Die hohe Ausbeute dieser Reaktion (95%) ist auf die zweite Nitrogruppe zurückzuführen, die die Umlagerung und den Ringschluß erleichtert (40).

Die Alkylierung von 7- Nitro-2-trifluormethylphenothiazin mit Dimethylaminopropylchlorid in Diethylenglykoldimethylether wurde entweder in Gegenwart von Natriumamid oder Natriumhydrid durchgeführt (40) und ergab 10-(3'-Dimethylaminopropyl)-7-nitro-2-trifluormethyl-phenothiazin (VI) in 67% Ausbeute. Mit Toluol als Lösungsmittel wurden bedeutend geringere Ausbeuten erhalten.

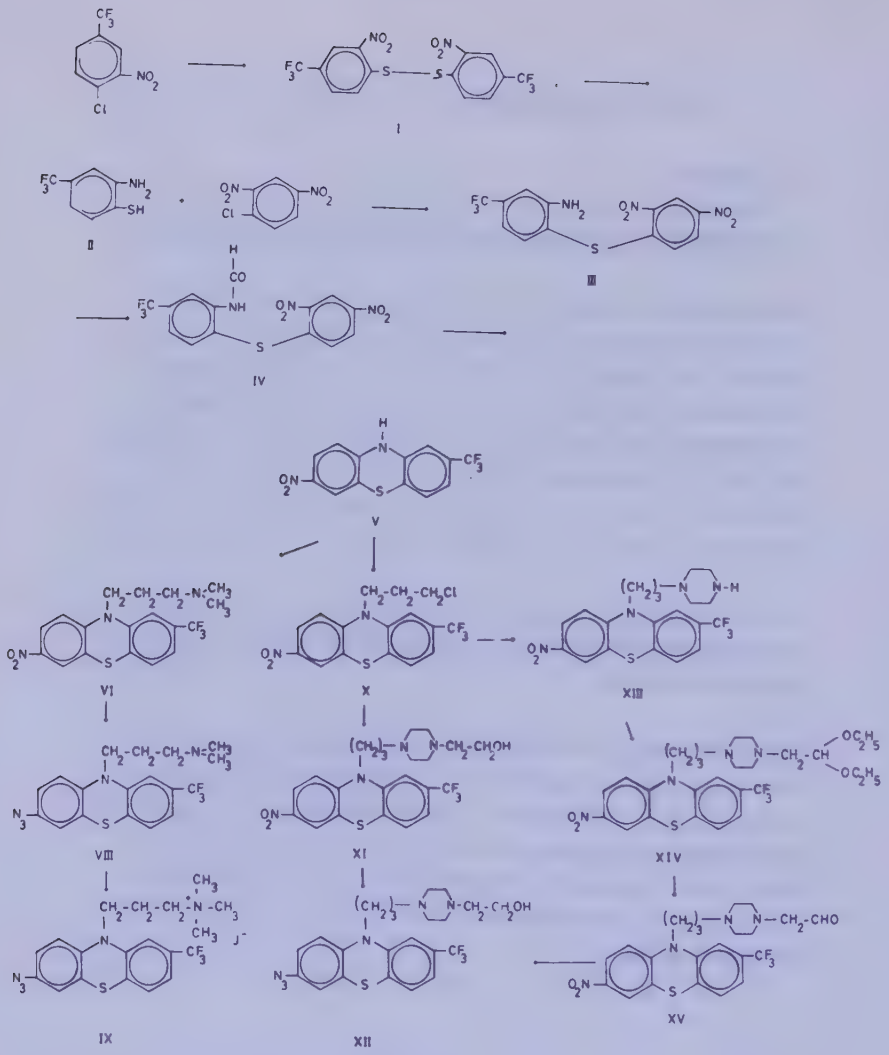


Abb.4: Synthesewege zur Herstellung von photoreaktiven Phenothiazinderivaten.

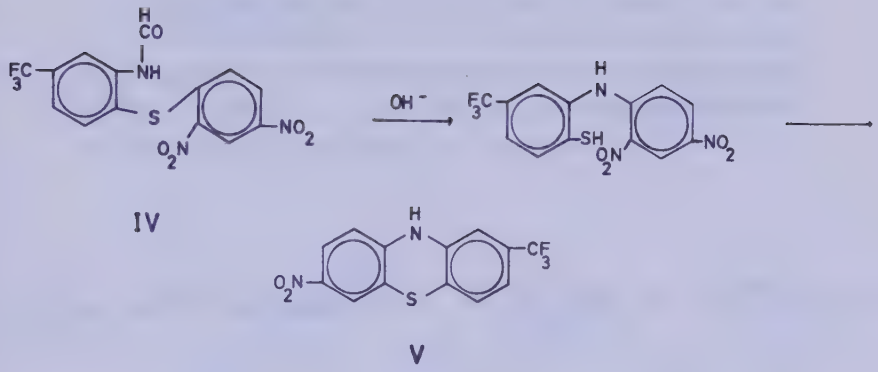


Abb.5: Ringschluß der Diphenylsulfidverbindung ("smiles rearrangement") zum 2,7-substituierten Phenothiazinderivat (59,72).

Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt: Zinn und Salzsäure, Zink und Essigsäure oder Eisen und Salzsäure bzw. Eisen und Calciumchlorid in 70%igem Ethanol. Eine Isolierung des Aminoderivates war für den nächsten Reaktionsschritt nicht nötig.
Die Aminogruppe wurde bei 0°C unter den üblichen Bedingungen ($NaNO_2$/HCl) diazotiert.

Zur Substitution der Diazoniumgruppe wurde das alkohollösliche Lithiumazid verwendet, so daß nach der Reduktion und Diazotierung in 70%igem Alkohol die Substitution mit Azid in demselben Arbeitsgang durchgeführt werden konnte (Ausbeute 54%) (Abb. 6).

Abb. 6: Überführung der Nitrogruppe in die Azidgruppe, R = Phenothiazin.

Die Synthese des quartären Derivates erfolgte aus 2-Trifluormethyl-7-azidopromazin (IX) durch Umsetzung mit Methyljodid in Aceton (42,43) in 60%iger Ausbeute. In gleicher Weise wurde von D.B. Wildenauer die ^{14}C markierte Verbindung hergestellt (112) (spezifische Aktivität: 11 Ci/Mol).

2. Syntheseweg zur Herstellung von radioaktiv markiertem 2- Trifluormethyl-7-azidopromazin

Eine Möglichkeit radioaktiv markiertes 2-Trifluormethyl-7-azidopromazin zu erhalten, ist das entsprechende 10-Aminopropylderivat mit ^{14}C markiertem Methyljodid umzusetzen (Abb.7).

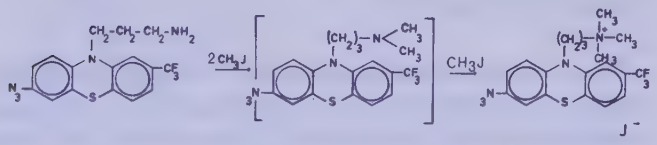


Abb. 7: Methylierung von 2-CF_3-7-N_3-10-Aminopropyl-phenothiazin zum tertiären bzw. quartären Aminoderivat.

Vorversuche mit nicht radioaktiv markiertem Methyljodid zeigten jedoch, daß diese Methylierung nicht auf der Stufe des tertiären Amins stehen bleibt. Es wurden überwiegend quartäre Produkte gebildet. Die Ausbeute an tertiärer Verbindung war so gering, daß die Reaktion für eine Radiosynthese nicht brauchbar war.

3. Synthese von Phenothiazinderivaten, die in Position 10 mit einer Piperazinylpropylseitenkette substituiert sind

Nach einer Vorschrift von Bossle et al. (44) wurde 7-Nitro-2-trifluormethyl-phenothiazin (V) mit Chloropropylbromid in Toluol und Natriumamid alkyliert. Im Gegensatz zur Synthese von 10-(3'-Dimethylaminopropyl)-7-nitro-2-trifluormethyl-phenothiazin (VI) gelang die Alkylierung in Toluol hier in 41%iger Ausbeute. Das entstandene Produkt (X) wurde mit Piperazinoethanol kondensiert (XI).

Die Herstellung von 2-Trifluormethyl-7-azido-10-(3-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)propyl)-phenothiazin (XII) erfolgte durch Reduktion der Nitrogruppe, Diazotierung und Substitution der Azidgruppe, wie auf Seite 11 beschrieben. Um diese Substanz radioaktiv zu erhalten, mußte ein Umweg eingeschlagen werden. Das Piperazinderivat (XIII) wurde mit Bromacetaldehyddiethylacetal umgesetzt. Das entstandene Diethylacetal (XIV) wurde mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und der gebildete Aldehyd (XV) mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert (XI). Diese Verbindung wurde wie vorher beschrieben zum Azid umgesetzt (XII).

Die Radiosynthese mit $[^3H]$Natriumborhydrid wurde von D.B. Wildenauer (112) durchgeführt.
(Spezifische Aktivität von 7-N_3-Fluphenazin (XI): 100 Ci/Mol).

b) Photochemisches Verhalten der Phenothiazinderivate (70,110)

Die Ultraviolettspektren von Triflupromazin und Triflupromazin-7-azid (Abb.8) zeigten nach Bestrahlung mit Licht ($\lambda > 310$nm) eine deutliche Abnahme des Maximums. Das Triflupromazin -7-azid war wesentlich schneller photolysiert als das Triflupromazin.

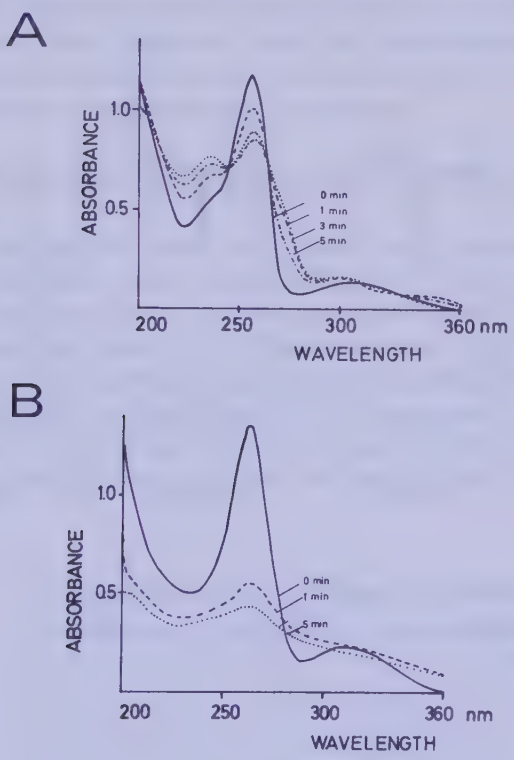


Abb.8: UV-Spektrum in Methanol von Triflupromazin (A) und 7-Azidotriflupromazin (B) vor und nach Bestrahlung.

Azidderivate haben ein charakteristisches Azidsignal bei 2100 cm^{-1} im Infrarot-Spektrum. Nach längerer Bestrahlung nimmt die Intensität ab. Nach 8 Minuten Photolyse war das Signal verschwunden (Abb.9).

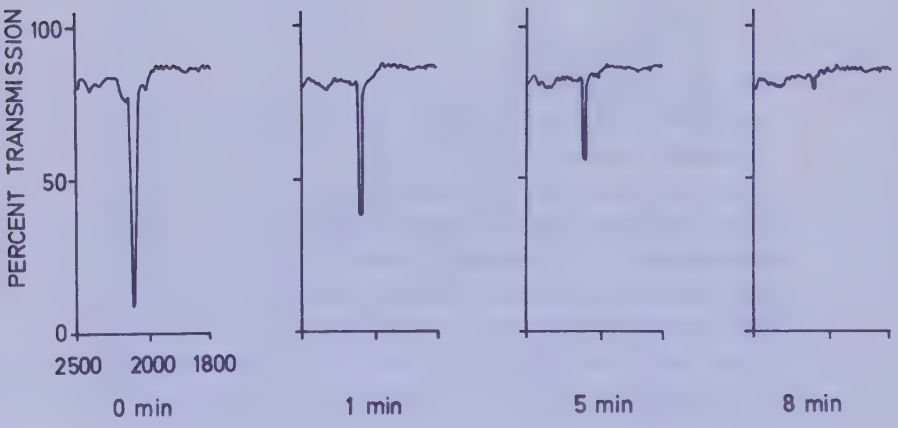


Abb.9: I.R.-Spektrum (Azid Bande) von 7-Azidotriflupromazin in Hexan nach Bestrahlung mit einer Lichtquelle von $\lambda > 310nm$.

C: Biologische Versuche

1. Charakterisierung der Phenothiazinderivate

Eine pharmakologische Charakterisierung der Phenothiazinderivate in Tierversuchen wurde nicht durchgeführt, da die synthetisierten Substanzen nicht für eine therapeutische Verwendung vorgesehen waren. Untersucht wurden ihre Auswirkungen auf osmotische Resistenz und Erythrozytengestalt. Diese wurden mit den nicht modifizierten Verbindungen verglichen.

1.1. Auswirkungen auf die osmotische Resistenz von Erythrozyten

Phenothiazine schützen in niederen Konzentrationen die Erythrozytenmembran vor osmotischer Hämolyse, in höheren Konzentrationen verursachen sie Hämolyse. In einer auf 50% osmotischen Hämolyse eingestellten Erythrozytensuspension bewirkte Chlorpromazin in einem Kontentrationsbereich von 10^{-7}M-$7x10^{-5}$M einen Schutz vor Hämolyse um 20-30%. Der maximale Schutz war bei einer Konzentration von $2x10^{-5}$M. Konzentrationen von 10^{-4}M und höher bewirkten Hämolyse (Abb.10) (8, 106).

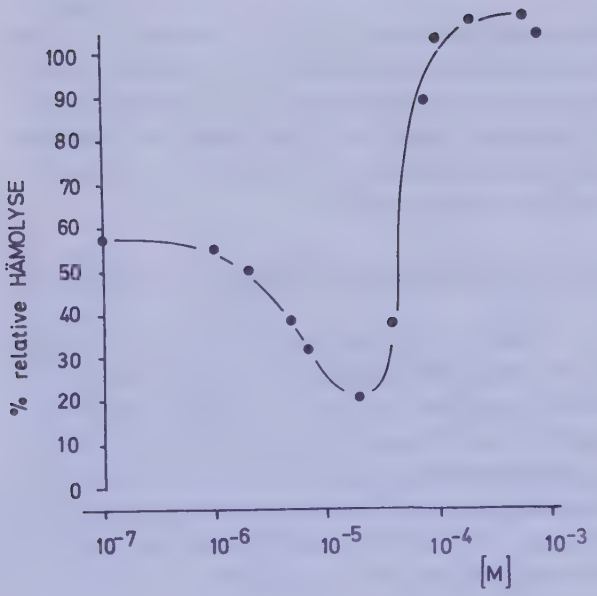


Abb.10: Hämolyseschutz durch Chlorpromazin. Erythrozyten (Hämatokrit 3%) wurden in einer hypotonen NaCl-Lösung, die 50% Hämolyse verursachte suspendiert. Chlorpromazin wurde in steigenden Konzentrationen hinzugegeben. Die Hämolyserate wurde durch Bestimmung der Absorption bei 540nm ermittelt und auf einen Kontrollwert in destilliertem Wasser (=100%) bezogen.

Für die synthetisierten Phenothiazine und für einige auserwählte bereits bekannte Derivate wurden die Konzentrationen bestimmt, die Erythrozyten vor Hämolyse schützen. Ein Vergleich der Werte zeigt, daß die Piperazinderivate wirksamer waren, als die Propylderivate. (Tabelle 1). Dies entspricht ihrer pharmakologischen Wirkung (111). Die Piperazinderivate sind im Vergleich zu den Propylderivaten in niederen Konzentrationen therapeutisch wirksam (11). Die quartären Derivate waren um 2 Zehnerpotenzen weniger wirksam als die tertiären Substanzen.

Tabelle 1

Die Phenothiazinkonzentration, die bei Erythrozyten maximalen osmotischen Schutz bewirkt, wurde wie in Abb.1 und im experimentellen Teil (E.7) beschrieben ermittelt.

Tertiäre Phenothiazine	Konz. mit maximalem osmotischen Schutz [M]	quartäre Phenothiazine	Konz. mit maximalem osmotischen Schutz [M]
Chlorpromazin	2×10^{-5}	Chlorpromazin methojodid	1×10^{-3}
Triflupromazin	1×10^{-5}	Triflupromazin methojodid	1×10^{-3}
7-N_3-Triflupromazin	1×10^{-5}		
Fluphenazin	4×10^{-6}	7-N_3-Triflupromazin methojodid	5×10^{-4}
7-NO_2-Fluphenazin	4×10^{-6}		
7-N_3-Fluphenazin	4×10^{-6}		

1.2. Einfluß auf die Erythrozytengestalt (42)

Die Phenothiazinderivate mit tertiärem Stickstoffatom transformierten in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5}M-$7x10^{-6}$M Discozyten zu Stomatozyten (Abb.11). Die Azidderivate waren wirksamer als Chlorpromazin bzw. Fluphenazin.

Die Phenothiazine mit quartärem Stickstoffatom transformierten in einem Konzentrationsbereich von $1.7x10^{-4}$M - $7x10^{-4}$M Discozyten zu Echinozyten (Abb.12). Die in 7-Stellung zusätzlich substituierten Substanzen ($3x10^{-4}$M - $7x10^{-4}$M) unterschieden sich nicht wesentlich von den unsubstituierten ($1.7x10^{-4}$M - $2x10^{-4}$M.

Die Konzentrationen, die eine Gestaltänderung bewirkten, waren - wie im Fall der osmotischen Resistenz - bei den quartären Substanzen höher als bei den tertiären.

DISCOZYTEN STOMATOZYTEN

	Konzentrationsbereich [M]
Chlorpromazin	7×10^{-5} - 1×10^{-4}
Fluphenazin	1×10^{-5} - 5×10^{-5}
7-N_3-Fluphenazin	4×10^{-6} - 7×10^{-6}
7-N_3-Triflupromazin	5×10^{-6} - 7×10^{-6}

Abb. 11: Tertiäre Phenothiazine transformieren Discozyten zu Stomatozyten. Es ist der Konzentrationsbereich angegeben, in dem 80% ± 10% der vorhandenen Zellen als Stomatozyten vorlagen (E.6).

DISCOZYTEN → ECHINOZYTEN

	Konzentrationsbereich [M]
Chlorpromazin-methojodid	1.7×10^{-4} - 2×10^{-4}
7-N_3-Triflupromazin-methojodid	3×10^{-4} - 7×10^{-4}

Abb. 12: Quartäre Phenothiazinderivate transformieren Discozyten zu Echinozyten. Es ist der Konzentrationsbereich angegeben, in dem 80% ± 10% der vorhandenen Zellen als Echinozyten vorlagen (E.6).

2. Photoaffinitätsmarkierung von Erythrozyten mit Chlorpromazin

Wurden intakte Erythrozyten mit tritiiertem Chlorpromazin 15 Minuten unter Stickstoffatmosphäre inkubiert und anschließend mit Licht von Wellenlängen über λ>310nm bestrahlt, so konnte ein zeit- konzentrationsabhängiger Einbau von Radioaktivität in die Erythrozytenmembran nachgewiesen werden . Abb. 13 zeigt, daß der Einbau bei allen verwendeten Konzentrationen mit der Photolysezeit zunimmt.

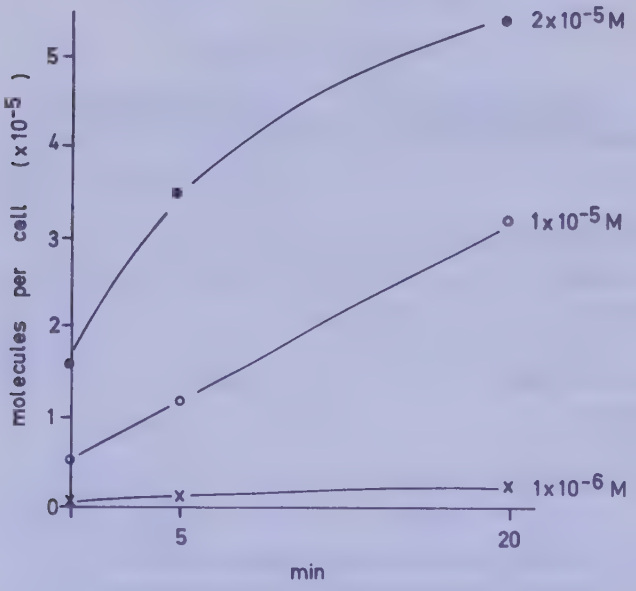


Abb. 13: Einbau von tritiiertem Chlorpromazin (spez. Aktivität: 0.42 Ci/mMol) in Erythrozytenmembrane. Intakte Erythrozyten wurden nach Inkubation mit Chlorpromazin in den angegebenen Konzentrationen photolysiert. Nach Waschen und Hämolyse wurde die Radioaktivität in den Membranen bestimmt.

Tabelle 2

Bestimmung des ^{3}H-Gehaltes in der Membran und im Hämolysat von mit [^{3}H-] Chlorpromazin photolysierten Erythrozyten (E.8.1.).

	Photolysezeit (Min.)	Einbau (% der Gesamtchlorpromazinkonz.)
menschliche Erythrozytenmembrane	0	1.3
	5	2.9
	20	4.5
Hämolysat	0	1.3
	5	2.9
	20	4.5

Die Erythrozyten wurden hämolysiert, und die Verteilung der Radioaktivität wurde in der Membran und im Hämolysat bestimmt (Tab.2). Ein relativ großer Prozentsatz an Radioaktivität war im Hämolysat zu finden. Dies deutet auf eine Aufnahme in die Zellen hin. Die Ursachen werden später diskutiert (Diskussion S. 55).

Um den Bindungsort des radioaktiv markierten Chlorpromazins nach der Photolyse in der Erythrozytenmembran festzustellen, wurden die Membranproteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (43) aufgetrennt (Abb. 14).

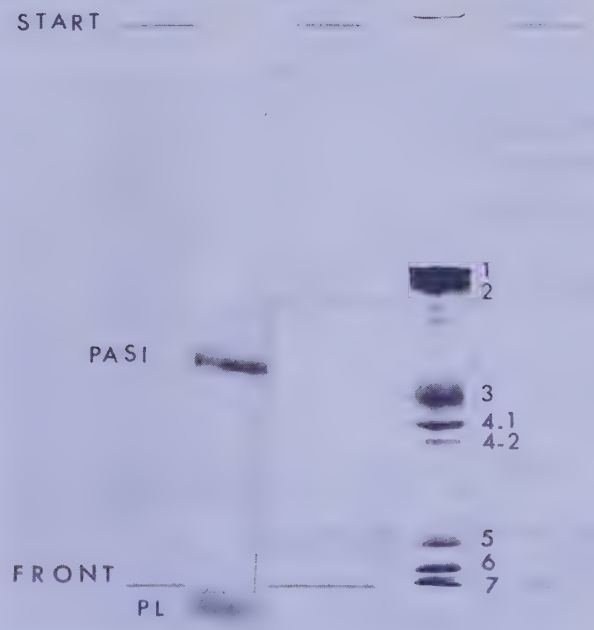


Abb. 14: SDS-PAGE (7.5% Acryamid) von menschl. Erythrozytenmembranproteinen

A: Perjodsäure-Schiffs-Färbung (PAS). Es färben sich Glycophorin A (PAS I) und die Phospholipide unterhalb der Front.

B: Mit Coomassie Blue lassen sich Spektrin (1.2), die Banden 3, 4.1, 4.2, 5, 6 und 7 anfärben.
Die Bezeichnung der Proteinbanden erfolgte nach Steck (20).

Bei den mit [^{3}H]-Chlorpromazin behandelten Erythrozyten wurde Radioaktivität im Bereich von Spektrin (Banden 1,2), der Bande 3 und im Bereich der Phospholipide nachgewiesen (Abb. 15 A). Das Hämolysat der mit tritiiertem Chlorpromazin inkubierten und bestrahlten Erythrozyten wurde ebenfalls der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen. Die Globinbande war radioaktiv markiert (Abb. 15 B).

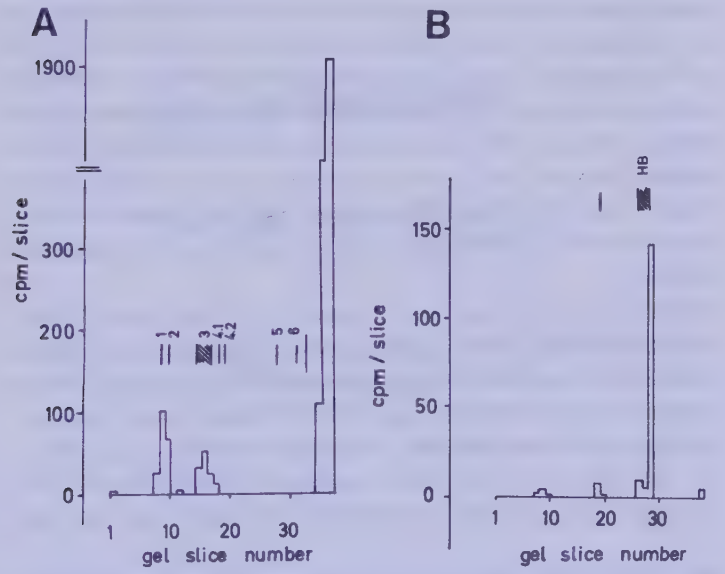


Abb. 15: SDS-PAGE von Erythrozytenmembranen und vom Hämolysat der [^{3}H]-Chlorpromazin (spez. Aktivität =.42 Ci/mMol) inkubierten und photolysierten Erythrozyten. Erythrozyten, die mit $2x10^{-5}$M Chlorpromazinlösung inkubiert worden waren, wurden nach 20 Minuten Photolyse hämolysiert.
A: SDS-PAGE (7.5% Acrylamid) der Membranproteine.
B: SDS-PAGE (10% Acrylamid) des Hämolysates. Radioaktivität wurde in den einzelnen Gelfraktionen ermittelt. Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt, ihre Bezeichnung erfolgte nach Steck (20).

3. Photoreaktion von Fluphenazin-7-azid und Triflupromazin-7-azido-methojodid mit intakten Erythrozyten

Für Versuche mit den Azidderivaten wurden Konzentrationen gewählt, die in der Versuchsanordnung (E.7.2.) maximalen Hämolyseschutz zeigten. Die Erythrozytensuspension wurde mit der entsprechenden Substanz 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Längere Inkubationszeiten hatten keinen Einfluß auf die Einbaurate. Für die Photolyse wurde eine Versuchsanordnung verwendet, die Licht von Wellenlängen unter 310nm weitgehend ausschloß. In Kontrollversuchen(Photolyse ohne Pharmakon) konnte keine Schädigung der Zellen (Hämolyse oder morphologische Veränderungen) nachgewiesen werden. Auch die Analyse der Kontrolle mittels SDS-PAGE (Abb.16) zeigte keine Veränderung der für die Erythrozytenmembran typischen Anordnung der Membranproteine im Vergleich zum unbestrahlten Wert.
Die mit den Phenothiazinaziden behandelten Erythrozyten wurden 10 Minuten lang bestrahlt; längere Photolysezeiten ohne erneute Zugabe von Phenothiazinaziden steigerten die Einbaurate nicht. Ungebundene Radioaktivität wurde durch Behandeln mit albuminhaltigem Puffer ausgewaschen. Beide Verbindungen - das tertiäre und das quartäre Derivat - zeigten trotz unterschiedlichen Konzentrationen ähnliche Einbauarten: 7.4% bzw. 7.8% (Tabelle 3).

Die Gründe für diesen Effekt könnten entweder unterschiedliche Verteilungskoeffizienten oder unterschiedliche Intensität der Photoreaktion sein.

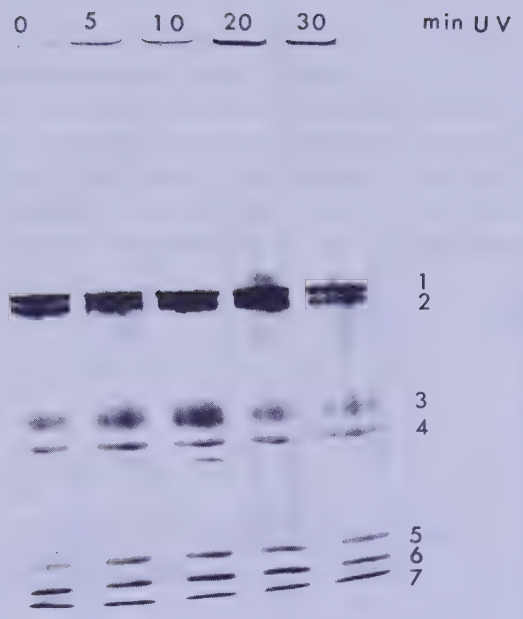


Abb. 16: SDS-PAGE (7.5% Acrylamid) von Erythrozyten, die zur Kontrolle ohne Pharmakon photolysiert wurden. Erythrozyten (HK10) wurden 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten mit Licht $\lambda > 310$nm bestrahlt und anschließend hämolysiert.

Tabelle 3

Einbau von $[^3H]$ Fluphenazinazid (a) (4×10^{-6}M) und $[^{14}C]$ Triflupromazin-azid-methojodid (b) (2×10^{-5}M) in Erythrozytenmembrane ud isolierte "ghosts".

		Einbau der Gesamtkonzentration		Photolysezeit
		tertiäre Verbindung a	quartäre Verbindung b	
Erythrozyten	Membrane	7.4	7.8	10
10% Hämatokrit	Hämolysat	8.5	0.2	
"ghosts" (10^9/ml)		15	19	5

3.1. Analyse der Bindungsstellen in der Erythrozytenmembran

Nach dem Solubilisieren der Membran mit SDS und ß-Mercaptoethanol wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In den einzelnen Proteinbanden wurde die Radioaktivität bestimmt. Bei den mit der tertiären Verbindung behandelten Membranen wurde Radioaktivität in der Bande 3, im Glycophorin (PAS) und in den Phospholipiden gefunden (Abb.17 A). Spektrin, das 25% der Proteinmenge ausmacht (Glycophorin A 5%), war verhältnismäßig wenig markiert.

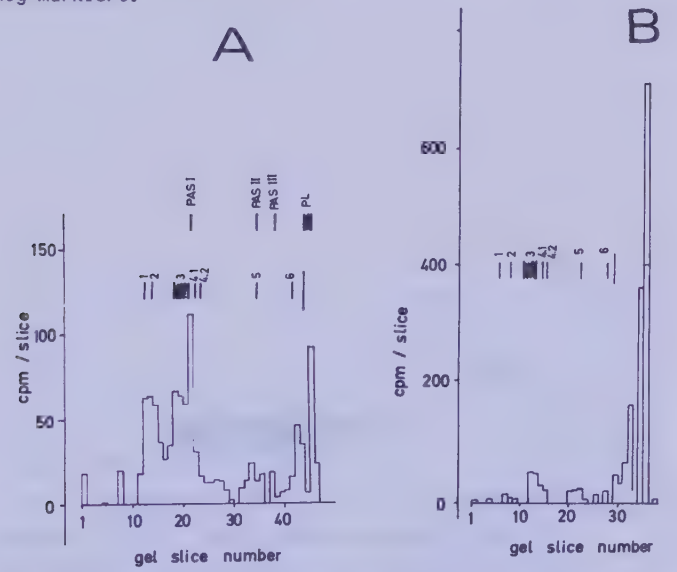


Abb. 17: SDS-PAGE (7.5% Acrylamid) von Erythrozyten, die mit tertiärer bzw. quartärer Verbindung inkubiert und anschließend photolysiert wurden.

A: Erythrozyten, die mit 4×10^{-6}M $[^{3}H]$Fluphenazinazid (spez. Aktivität 100 Ci/Mol) inkubiert und 1 Minute photolysiert worden waren ($\lambda > 310$nm).

B: Erythrozyten, die mit 5×10^{-5}M $[^{14}C]$ Triflupromazinazid-methojodid (spez. Aktivität 11,6 Ci/Mol) inkubiert und 5 Minuten photolysiert ($\lambda > 310$nm) worden waren.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der tertiären Verbindung wurden durch die quartäre Verbindung nur die Phospholipide radioaktiv markiert (Abb. 17 B und 18). Die Phospholipide wurden durch Perjodsäure / Schiffsreagenzbehandlung im Elektropherogramm angefärbt, eingebaute Radioaktivität durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 18).

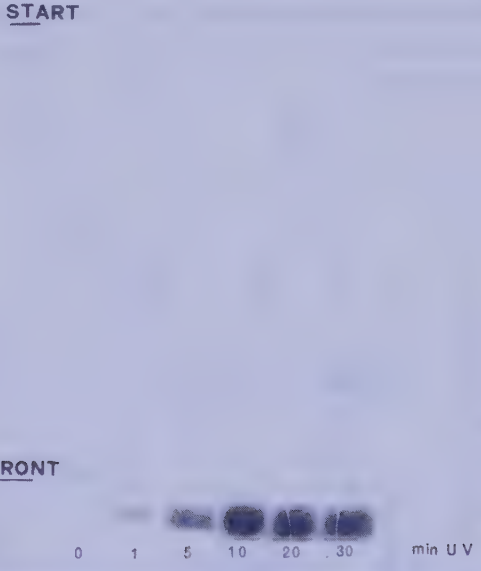


Abb. 18: Autoradiographie eines SDS-Polyacrylamidgeles (7.5% Acrylamid). Erythrozyten wurden mit [^{14}C] -Trifluproma-zin-azid-methojodid (spez. Aktivität: 11,6 Ci/Mol) in-kubiert und dann bei $\lambda > 310$nm photolysiert. (Bestrahlungszeiten 0, 1, 5, 10, 20 und 30 Minuten). PL = Phospholipide

Die Phospholipide der Erythrozyten wurden nach der Methode von Ohlander (64) isoliert und durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (108, 109). Abb. 19 zeigt eine typische Auftrennung.
Bei den Lipiden der mit der quartären Verbindung photolysierten Erythrozyten wurden die in Abb. 19 bezeichneten Flecke gefunden. Eine Identifizierung der radioaktiv markierten Phospholipide wurde nicht durchgeführt.

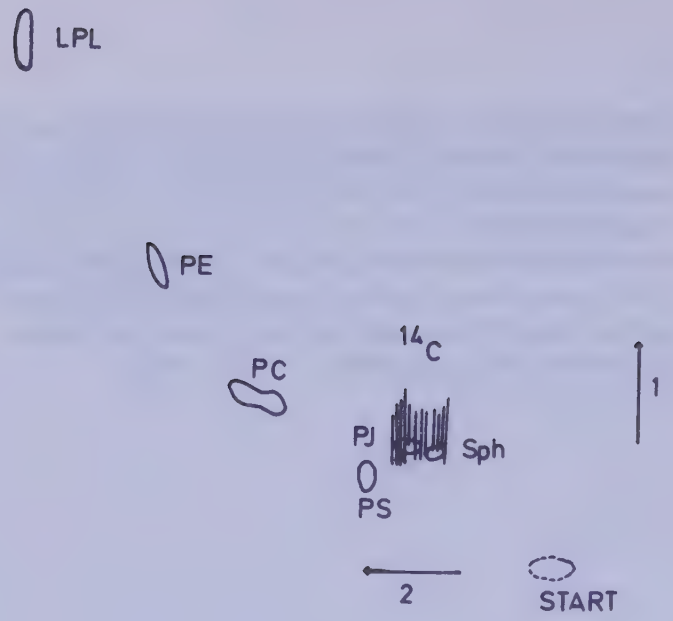


Abb. 19:

Auftrennung der Erythrozytenlipide durch 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie.

Laufmittel 1: Chloroform 65/ Methanol 35/ Ammoniak (28%) 5

Laufmittel 2: Chloroform 5/ Aceton 2/ Methanol 1/ Essigsäure 1/ Wasser 0.5.

Nach Reaktion mit Joddampf waren folgende Lipide sichtbar:

LPL = neutrale Lipide ("low polar lipids")

PE = Phosphatidylethanolamin

PC = Phosphatidylcholin

PI = Phosphatidylinositol

PS = Phosphatidylserin

Sph = Sphingomylin

Identifizierung erfolgte nach Rouser (108) und Kates (109). Radioaktivität wurde mittels eines Dünnschichtscanners ermittelt (gestrichelter Bereich).

3.2. Untersuchung der Reaktion von Phenothiazinaziden mit Bestandteilen des Hämolysates

Bei den Versuchen mit dem tertiären Phenothiazinderivat und intakten Erythrozyten wurden nach 10 Minuten Bestrahlungszeit ca. 8.5% der Substanz (Tabelle 4) an Bestandteile des Zytoplasmas gebunden. Im Gegensatz dazu war das quartäre Derivat (Tab. 4) im Zytoplasma nicht nachweisbar. Wurde das Hämolysat der mit tertiärem Phenothiazin photolysierten Erythrozyten mittels SDS-PAGE aufgetrennt, konnte radioaktive Markierung der Globinbande nachgewiesen werden (Abb. 20). Im unbestrahlten Kontrollwert war nach 10 Minuten Inkubationszeit nur 0.7% der Gesamtkonzentration derSubstanz im Zytoplasma nachweisbar. (Tabelle 4).

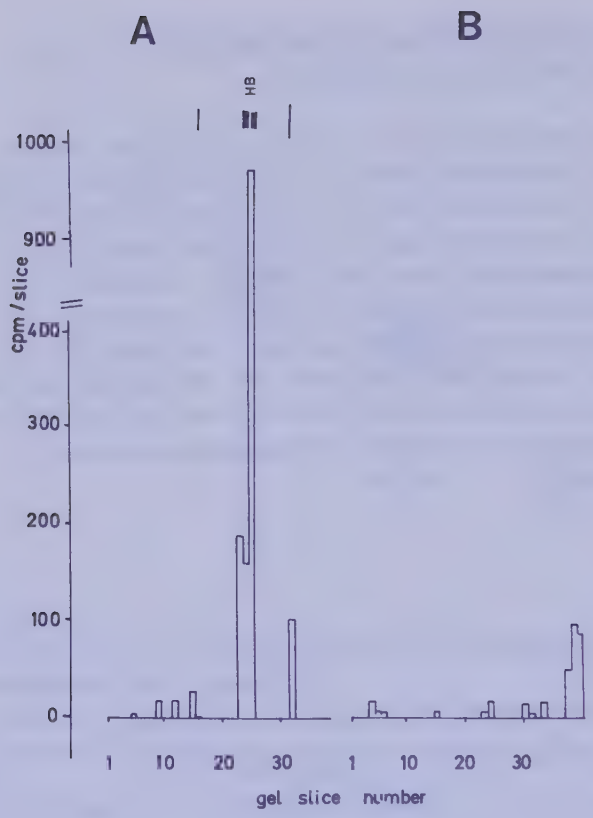


Abb. 20: SDS-PAGE (Acrylamid 10%) des Hämolysates von Erythrozyten, die mit $[^3H]$ 7-N_3-Fluphenazin ($4x10^{-6}$M) inkubiert und anschließend photolysiert wurden.
(A: 10 Minuten, B: 0 Minuten Bestrahlungszeit).

Tabelle 4

Einbau von $[^{3}H]$ 7-N_3-Fluphenazinazid und $[^{14}C]$ -Triflupromazin-azid-methojodid in das Zytoplasma der Erythrozyten.

		Photolysezeit (Min.)	Einbau (% der Gesamtkonzentration)
Hämolysat	Fluphenazinazid ($4x10^{-6}M$)	0	0.7
		10	8.5
	Triflupromazin-azid-methojodid ($2x10^{-5}M$)	10	0.2

4. Photoreaktion von Fluphenazinazid und Triflupromazin-azid-methojodid mit isolierten Erythrozytenmembranen ("ghosts"[x])

Die nach der Methode von Steck und Kant (45) isolierten Erythrozytenmembrane wurden am Tag ihrer Herstellung verwendet. Um die Werte der "ghost"-Versuche mit denen der Erythrozytenversuche vergleichen zu können, wurde die "ghost"-menge eingesetzt, die dem Proteingehalt der Membrane bei den Erythrozytenversuchen entsprach. Die Konzentrationen der Phenothiazinazide waren dieselben wie bei den Erythrozytenversuchen. Nach 10 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln wurden die "ghost"-suspensionen unter den gleichen Bedingungen wie in 3. photolysiert. Nicht kovalent gebundene Substanz wurde durch Waschen mit albuminhaltigem Puffer entfernt. Nach 5 Minuten Bestrahlungszeit waren 15% des tertiären bzw. 20% des quartären Phenothiazinderivates in der Membran gebunden. Längere Photolysezeiten steigerten die Einbaurate nicht mehr (Abb.21).

---

x)

Isolierte Erythrozytenmembrane werden wegen ihrer Gestalt und wegen ihres Aussehens im Englischen als "ghosts" bezeichnet. Die Übersetzung wie z.B. "Schatten" wird in der deutschen Literatur kaum verwendet.

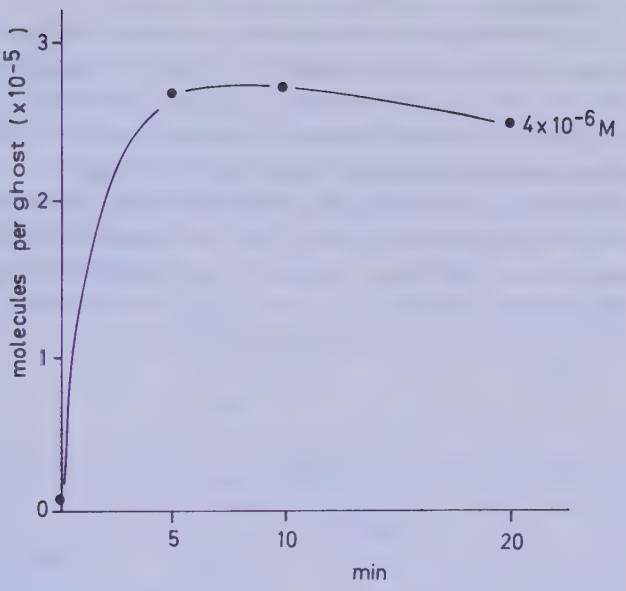


Abb. 21: Einbau von [^{3}H] Fluphenazinazid ($4x10^{-6}$M) in "ghosts" nach Photolyse.

4.1. Analyse der Bindungsstellen in den "ghosts"

Die Membranproteine der "ghosts" wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und in den einzelnen Proteinbanden die Radioaktivität bestimmt. Bei der tertiären Verbindung waren die Bande 3, Glycophorin (PAS I, II, III) und die Phospholipide radioaktiv markiert, in den peripheren Proteinen, wie z.B. Spektrin und in der Bande 5 war nur wenig Radioaktivität nachweisbar (Abb. 22A).
Bei der quartären Verbindung war zusätzlich Spektrin (Bande 1 und 2) radioaktiv markiert (Abb.22 B). Im Elektropherogramm der unbestrahlten Kontrollwerte konnte keine Radioaktivität nachgewiesen werden.

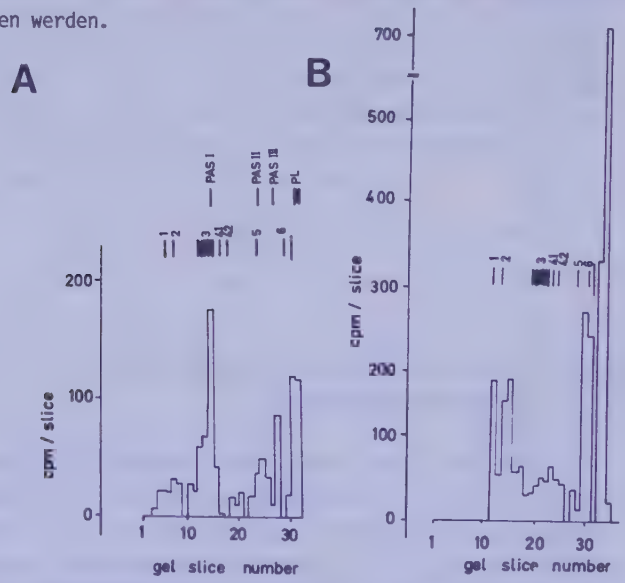


Abb. 22: SDS-PAGE (7.5% Acrylamid) von "ghosts", die mit tertiärem (A: $[^{3}H]$-Fluphenazinazid, $4x10^{-6}M$) bzw. mit quartärem (B: $[^{14}C]$-Triflupromazin-azid-methojodid, $5x10^{-5}M$) inkubiert und 5 Minuten photolysiert wurden.

5. Photoreaktionen von Fluphenazinphenylazid mit intakten Erythrozyten und "ghosts"

Da die Einführung eines zusätzlichen Substituenten in 7-Stellung des Phenothiazingrundgerüstes (vgl.Fluphenazin-7-azid und Triflupromazin-7-azid) die Eigenschaften der Phenothiazine verändern könnte, wurde ein Derivat synthetisiert, das die photoreaktive Gruppe in der Seitenkette enthält, (Abb. 23). Der Synthese lag die Idee zugrunde, daß die geringste Veränderung der Wirkungen durch Modifikation der Seitenkette-Verlängerung über den Piperazinring hinaus - (6, 7), erfolgt. Fluphenazinphenylazid wurde von D.B. Wildenauer synthetisiert und radioaktiv markiert (spez. Aktivität: 42 Ci/mMol) (112).

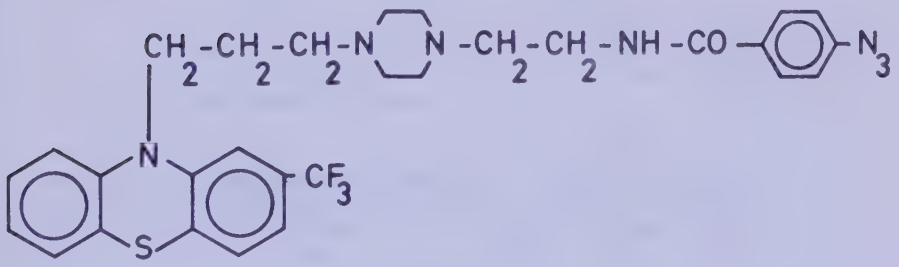


Abb. 23: Strukturformel von 2-Trifluormethyl - 10-(4-phenyl-azido-4'-acetamido-1'-propyl-piperazinyl)-phenothiazin = Fluphenazinphenylazid.

Wurden mit dem Fluphenazinphenylazidderivat inkubierte Erythrozyten mit Licht von Wellenlängen über 310nm bestrahlt, so wurde ein zeit- und konzentrationsabhängiger Einbau in die Membran erhalten (Abb. 24).

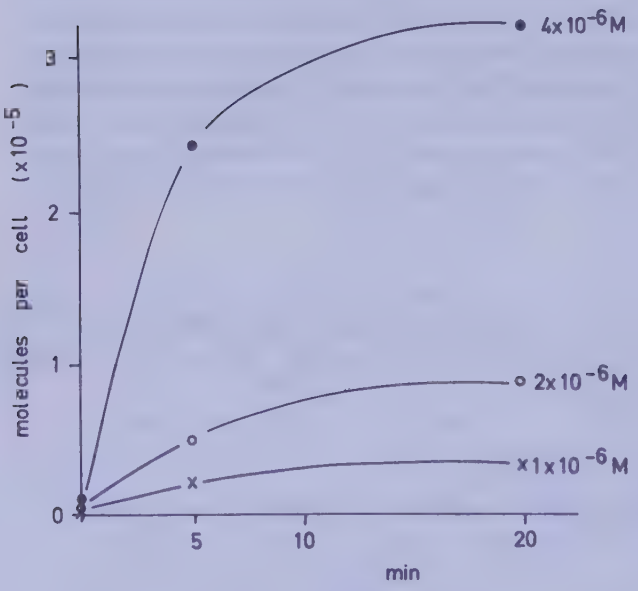


Abb. 24: Einbau von [^{3}H] Fluphenazinphenylazid in intakte Erythrozyten nach Photolyse bei $\lambda > 310$ nm.

Nach 5 Minuten Bestrahlungszeit war der maximale Einbau erreicht. Längere Bestrahlung ohne erneute Zugabe von unphotolysiertem Material zeigte keinen Effekt mehr.
Nicht kovalent gebundene Substanz war auswaschbar (Abb. 24 und Tabelle 5).
Wurde das Hämolysat nach 0 Minuten und nach 5 Minuten Bestrahlungszeit der Erythrozyten untersucht, so waren bei 0 Minuten Photolysezeit 0.4% und nach 5 Minuten 12% der Gesamtradioaktivität gebunden (Tabelle 5).

Tabelle 5

Einbau von $[^3H]$ Fluphenazinphenylazid ($4x10^{-6}M$) in die Membran und ins Hämolysat von intakten Erythrozyten und in "ghosts".

	Photolysezeit (Min.)	Einbau (% der Gesamtkonzentration)
menschl. Erythrozytenmembrane	0	0.37
	5	10.18
	20	13.44
Hämolysat	0	0.4
	5	12.7
	20	14.6
"ghosts" 10^9/ml	0	6.2
	5	24.3
	10	23.9

5.1. Analyse der Bindungsstellen

Nach Auftrennung der Membranproteine der Erythrozytenversuche mittels SDS-PAGE wurde durch Autoradiographie Radioaktivität in der Bande 3, in PAS und in den Phospholipiden nachgewiesen, in geringerem Maße war Spektrin (Bande 1 und 2) markiert (Abb.25).

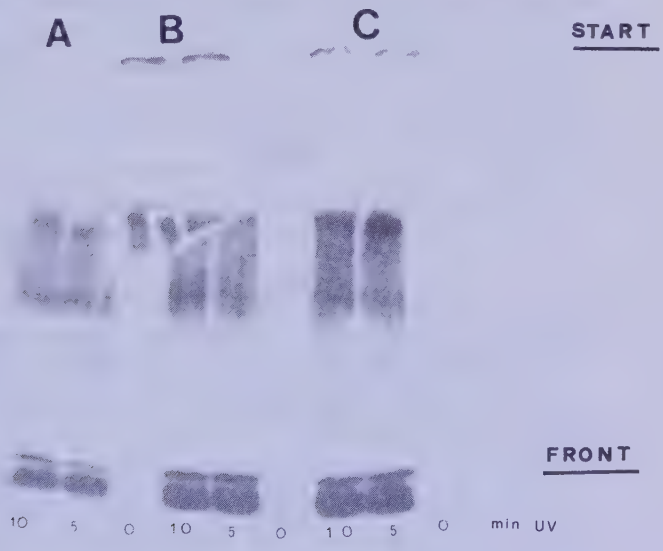


Abb. 25: Autoradiographie eines SDS-Polyacrylamidgeles (7.5% Acrylamid) von Erythrozyten, die mit [^{3}H]Fluphenazinphenylazid inkubiert und photolysiert wurden. A: $1x10^{-6}$M; B: $2x10^{-6}$M und C: $4x10^{-6}$M.

In dem Proteinmuster der mittels SDS-PAGE aufgetrennten "ghosts" (Abb. 26), waren die Bande 3, PAS und die Phospholipide radioaktiv markiert.

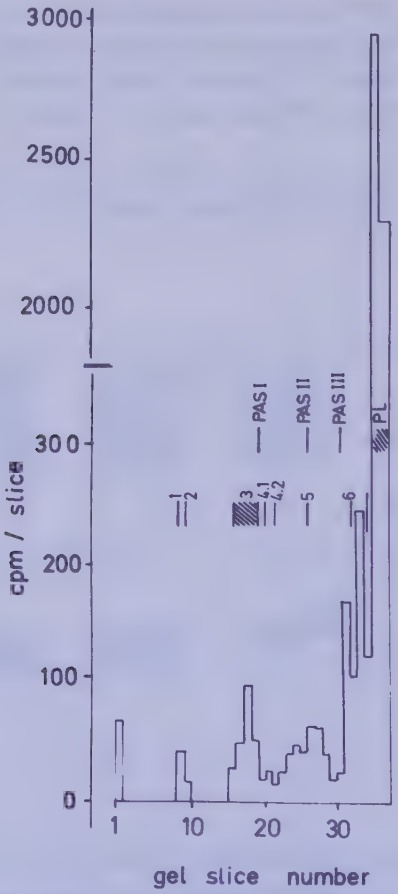


Abb. 26: SDS-PAGE von "ghosts" nach Inkubation und Photolyse mit [^{3}H]Fluphenazinphenylazid (4×10^{-6}M) (Bestrahlungszeit: 5 Minuten; Acrylamidkonzentration des SDS-Geles 7.5%).

D. Diskussion

Die Besonderheit der "Photoaffinity Labeling" Technik besteht darin, daß ein photosensitiver Ligand eine kovalente Bindung an seinem Bindungsort ausbilden kann (83). Dadurch, daß erst nach Aktivierung mit Licht die photosensitive Gruppe reagiert, kann der Zeitpunkt der Fixierung der Substanz an die Bindungsstellen gesteuert werden. Durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung ist die Substanz an den Bindungsort fixiert und kann durch ihre zusätzliche radioaktive Markierung wieder nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Photoaffinitätsmarkierung sollten Phenothiazine untersucht werden, über deren Lokalisation in bzw. an den Membranen, wie in der Einleitung ausgeführt, unterschiedliche Theorien existieren (vgl. S.3).

In der vorliegenden Arbeit wurden Erythrozyten und "ghosts" verwendet, da über ihre molekulare Membranstruktur mehr bekannt ist, als über jede andere Zellmembran (21,71,81,82,85, 88,89,92,102).Die Erythrozytenmembran ist in Abb. 27 schematisch dargestellt. Die in die Lipidschicht eingebauten Proteine werden in integrale und periphere Proteine eingeteilt: die integralen Proteine sind in diese Lipiddoppelschicht eingelagert oder durchdringen sie; die peripheren sind lose mit der Membran assoziiert. Die Proteine können mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und ß - Mercaptoethanol solubilisiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden (Abb. 27B)(18-22).

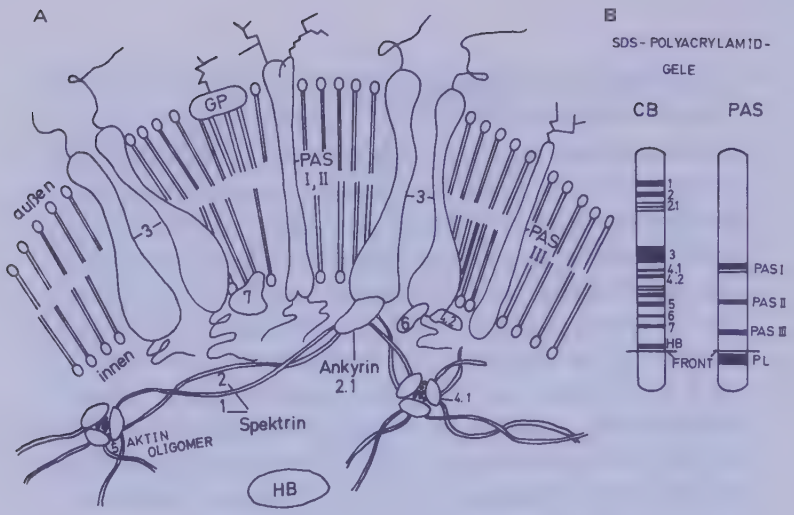


Abb. 27: A: Modifiziertes Modell der Erythrozytenmembran nach Branton (21), Steck (20) und Lux (19).
PAS: "Perjodic acid staining"-Glycophorin
GP: Glycoprotein

B: Schematische Auftrennung der Membranproteine mittels SDS-Gelelektrophorese. Die Bezeichnung der Proteinbanden erfolgte nach Steck (20).
C B: Coomassie Brilliant Blue gefärbte Proteine
PAS: Proteine und Lipide, die sich mit Perjodsäure und dem Schiff'schen Reagenz sichtbar machen lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen anhand der folgenden Fragen diskutiert werden:

1. Welche Gründe sprechen für die Einführung eines UV - sensitiven Substituenten in das Phenothiazinmolekül?

2. Gibt es Unterschiede in den Bindungsorten der synthetisierten Phenothiazinderivate in Erythrozyten im Vergleich zu denen in isolierten Erythrozytenmembranen?

3. Unterscheiden sich die tertiären bzw. quartären Phenothiazine bezüglich ihrer Bindungsorte?

4. Wie können die unterschiedlichen Bindungsorte der Phenothiazinderivate im Hinblick auf die Gestaltänderung der Erythrozyten interpretiert werden?

1. Welche Gründe sprechen für die Einführung eines UV - sensitiven Substituenten in das Phenothiazinmolekül?

Chlorpromazin ist photosensitiv (48,70,73). Deshalb sollte untersucht werden, ob diese Substanz für Photoaffinitätsmarkierung brauchbar ist. Photolyseversuche von $[^{3}H]$ Chlorpromazin mit Erythrozyten zeigten einen langsamen, kontinuierlich ansteigenden Einbau von Radioaktivität in die Membran (Abb. 13). Die Photolysezeiten für Chlorpromazin sind jedoch lang. Thoma (46) konnte bei Photolyseversuchen mit einer 0,2%igen Chlorpromazinlösung nach 40 Stunden Bestrahlungszeit mit Ultraviolettlicht von 254nm und 360nm noch 37% nicht photolysiertes Chlorpromazin nachweisen. Nejmeh und Pilpel (47) bestrahlten monomolekulare Lecithinschichten, die mit Chlorpromazin

inkubiert worden waren, 4 Stunden lang mit Ultraviolettlicht. Nach dieser Zeit konnten sie nachweisen, daß erst 15-30% des Chlorpromazins zersetzt war.
Nach Felmeister (48) folgt die Photoreaktion von Chlorpromazin einem radikalischen Mechanismus: nach Abspaltung eines Elektrons bilden sich freie Radikale (Abb. 28), die von Borg (49) und Forrest (50) nachgewiesen werden konnten. Diese Radikale können unter anderem mit Doppelbindungen reagieren, Wasserstoffatome abstrahieren und zu Polymerisationsprodukten führen. Sie können sehr langlebig sein. Akera und Brody (52,68) konnten zum Beispiel zeigen, daß ein freies Chlorpromazinradikal in Gegenwart von Proteinen 4 Minuten lang existiert.
Aus diesen langen Photolysezeiten ergeben sich folgende Nachteile:

1. Lange Bestrahlung mit UV-Licht kann zu Schädigungen der Membran führen. Dies zeigte sich auch bei den Versuchen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Nach 45 Minuten Bestrahlungszeit von Erythrozyten trat Hämolyse auf.

2. Bei langen Bestrahlungszeiten können langlebige reaktive Photolyseprodukte (53) entstehen, die Zeit haben, sich einen geeigneten Reaktionspartner herauszusuchen. Dadurch diffundieren sie vom ursprünglichen Aufenthaltsort weg. Solche Folgereaktionen können zu falschen Schlußfolgerungen führen. Zum Beispiel könnte die Markierung des Spektrins bei den Photolyseversuchen mit Chlorpromazin auf eine solche selektive Reaktion eines elektrophilen Radikals zurückzuführen sein.

Bei der Bestrahlung von Aziden dagegen erfolgt die Ausbildung eines reaktiven Nitrens (94,95) (Abb. 29), das im Allgemeinen

eine höhere Lebensdauer besitzt (für ein aromatisches Nitren etwa 0,1 - 1 ms) (34). Photolyseversuche mit Aziden zeigten nach 8-10 Minuten Bestrahlungszeit ein vollständiges Verschwinden des charakteristischen Azidpeaks im I.R.-Spektrum (Abb. 9).

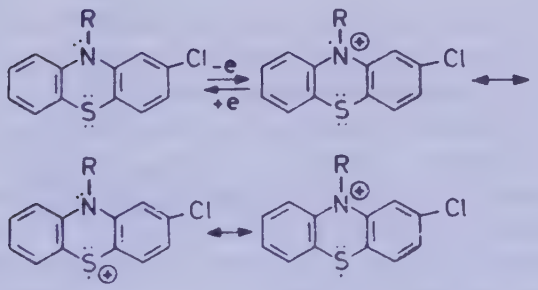


Abb. 28: Durch die Abspaltung eines Elektrons am Chlorpromazinmolekül bildet sich ein rotgefärbter Komplex, der durch Mesomerie stabilisiert ist (48).

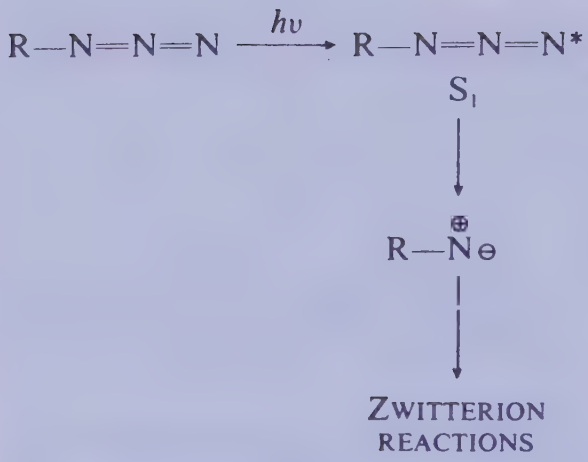


Abb. 29: Schematische Darstellung eines typischen photochemischen Reaktionsschrittes von Aziden unter Ausbildung eines reaktiven Nitrens (54).

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Chlorpromazin war bei Photoaffinitätsmarkierungen mit Phenothiazinaziden nach kurzer Zeit (5-10 Minuten) der maximale Einbau erreicht (Abb. 24).
Ein weiterer Vorteil der Nitrene im Vergleich zu den Radikalen ist, daß sie mit C-H-Bindungen reagieren können (53). Diese Eigenschaft ist wichtig, denn dadurch können auch hydrophobe Regionen der Membran markiert werden, d.h. sie können mit ihrem nächstliegenden Nachbarn reagieren.

Ein Nachteil der Nitrene ist jedoch, daß sie zu elektrophilen Reaktionen neigen können, das heißt, Reaktionen mit Doppelbindungen und nichtbindenden Elektronenpaaren werden eventuell bevorzugt. Sind nun die Nitren erzeugenden Verbindungen in einer mobilen Umgebung, wie es beim Einbau in biologische Membranen der Fall ist, dann können sie mit weiter entfernten nukleophilen Reaktionspartnern reagieren. Diese Selektivität kann durch kurze Photolysezeiten oder durch Anwendung von niederen Photolysetemperaturen (0°C - 4°C) weitgehend vermindert werden. Bei niederen Temperaturen läuft die Photolysereaktion ebenso ab, molekulare Diffusionsvorgänge finden dagegen verlangsamt statt (55).

> Ihre reaktiven und kurzlebigen Zwischenstufen sowie die Besonderheit auch mit C-H-Brücken eine kovalente Bindung ausbilden zu können, waren die Hauptargumente für die Synthese von Phenothiazinaziden und ihre Verwendung zur Photoaffinitätsmarkierung von Erythrozyten.

Da die hier verwendeten Substanzen zusätzlich radioaktiv markiert waren, kann man von einer Zweifachmarkierung sprechen:

die Azidgruppe als "Photoaffinity Label" und ^{3}H oder ^{14}C als radioaktive Markierung: die durch Photoreaktion erzeugte Bindung kann aufgrund der radioaktiven Markierung bestimmt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, daß reversible Bindungsversuche im Dunkeln durchgeführt werden können. Die nicht photolysierte Substanz kann durch mehrmalige Waschvorgänge fast vollständig entfernt werden (Kontrollversuch Tabelle 5).
Die in den bestrahlten Proben verbleibende, nicht auswaschbare Radioaktivität wurde als Hinweis auf eine kovalente Bindung aufgefaßt. Die Beständigkeit der Bindung im Solubilisierungspuffer, der durch seinen Gehalt an Detergens und ß - Mercaptoethanol, sowie durch das Erhitzen nicht kovalente Bindungen löst und in der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden als Beweis dafür angesehen.
Die Ausbeute einer solchen photochemischen Reaktion ist jedoch selten höher als 20% der während der Photolyse eingesetzten Gesamtkonzentration. Ein größerer Teil der Substanz wird photolysiert, ohne eine kovalente Bindung mit der Membran auszubilden (Wasserstoffabstraktion, intermolekulare Reaktionen, Reaktionen zwischen zwei Phenothiazinmolekülen) und ist auswaschbar. Die ermittelten Bindungswerte lassen also keine quantitativen Aussagen über die Bindungsstellen der Phenothiazine in der Membran zu.

2. Gibt es Unterschiede in den Bindungsorten der synthetisierten Phenothiazinderivate in Erythrozyten im Vergleich zu denen in isolierten Erythrozytenmembranen?

Photoaffinitätsmarkierung von hydrophoben Membranregionen ist eine in den letzten Jahren häufig verwendete Versuchsanordnung (74-79). Es wurden mehrere Verbindungen entwickelt, die an

integrale Segmente von Membranproteinen, die im Innern der Lipidschicht ("hydrphobic core") angeordnet sind, binden sollen. Verwendet wurden photoaktivierbare Vorstufen von Arylnitrenen (67, 97) oder von Carbenen (57, 69, 74, 79, 96). Es wurden hydrophobe oder amphiphile Substanzen verwendet, die sich in Lipidschichten einlagern können. Brunner und Semenza (56) konnten mit radioaktiv markiertem 3-(CF_3)-3-($m^{125}J$) Jodophenyldiazirin, das ein Carben ausbilden kann, Lipide, die Bande 3 und Glycophorin der Erythrozytenmembran markieren. Nur einen geringen Anteil der Radioaktivität konnten sie in den peripheren Proteinen wie Spektrin nachweisen. Auch Berovici und Gitler (67) fanden den Hauptteil der Radioaktivität bei Photoaffinitätsversuchen von Erythrozyten mit ^{125} Jodonaphtylazid in der Bande 3 und im Glycophorin, während Spektrin einen geringen Radioaktivitätsanteil aufwies. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen "ghost"-Versuchen mit tertiären Phenothiazinaziden erhalten. Obwohl die Membran von beiden Seiten zugänglich ist, wurde nur sehr wenig Spektrin, das an der Innenseite der Membran ein Zellskelett bildet, markiert. Die Substanz wurde in erster Linie an die integralen Proteine und die Phospholipide gebunden. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß sich die Substanz im hydrophoben Teil der Membran befindet. Tertiäre Phenothiazine lösen sich also im hydrophoben Kern der Erythrozytenmembran.
In intakte Erythrozyten wurde nach 10 Minuten Photolysereaktion (Tab. 3) durchschnittlich 8-10% der Gesamtradioaktivität gebunden, in isolierte Membranen 10-20% (Tab. 3). Die niedrige Ausbeute bei den Erythrozytenversuchen könnte bedingt sein durch die stärkere Lichtabsorption der Erythrozyten im Vergleich zu den "ghosts". Im Gegensatz zu den "ghost"-Versuchen war bei den Erythrozytenversuchen das Spektrin stärker markiert. 7-8% an Radioaktivität der Ausgangskonzentration konnte im Hämolysat (Tab. 3) nachgewiesen werden.

Dies könnte durch die Fähigkeit der Phenothiazine zur Sulfoxidbildung bedingt sein und kann auf die Reaktion von Phenothiazinradikalen mit Sauerstoff zurückgeführt werden (48). Sulfoxidbildung tritt besonders leicht im Blut auf.
Traficante (58) konnte nachweisen, daß die Sulfoxidbildung des Chlorpromazins im Blut durch Hämoglobin katalysiert wird. Sulfoxidbildung, katalysiert durch Hämoglobin, könnte die Ursache für die in den Erythrozytenversuchen gefundenen Markierungen von Spektrin in der Membran und der Globinbande im Hämolysat sein. Es ist leicht einzusehen, daß die polaren Sulfoxide aus den hydrophoben Membranregionen in das Zellinnere wandern.

Photoreaktion von hämoglobinfreien "ghosts" mit tertiären Phenothiazinderivaten zeigte keine Spektrinmarkierung.

> Die überwiegende Markierung von integralen Proteinen bei den "ghosts", obwohl die Membran von beiden Seiten zugänglich ist und Phenothiazinazid auch mit Spektrin reagieren könnte, ist ein deutlicher Hinweis für die Löslichkeit des tertiären Phenothiazinderivates im Lipidkern der Membran.

3. Unterscheiden sich die tertiären bzw. quartären Phenothiazine bezüglich ihrer Bindungsorte?

Die Photoaffinitätsmarkierung der "ghosts" bzw. Erythrozyten mit tertiären Phenthiazinazidderivaten erbrachte zwar deutliche Hinweise für ihre Löslichkeit in der Membran, jedoch konnte mit diesen Versuchen nicht ausgeschlossen werden, daß die Reaktionen mit den Membranproteinen, Bande 3 und Glycophorin, an den Teilen der Proteine erfolgt, die aus der Membran heraus-

ragen (98,99). Diese Möglichkeit konnte weitgehend ausgeschlossen werden durch den Vergleich mit den Reaktionsstellen der quartären Phenothiazine.
Aufgrund ihrer permanenten positiven Ladung ist es unwahrscheinlich, daß diese Verbindungen in die Membran eindringen können. Es muß daher postuliert werden, daß sie ausschließlich mit der Membranaußenseite reagieren. Tatsächlich zeigten bei intakten Erythrozyten die Substanzen mit quartärem Stickstoffatom ein völlig anderes Bindungsmuster als die Derivate mit tertiärem Stickstoffatom. Es wurden ausschließlich die Phospholipide radioaktiv markiert. Im Unterschied dazu wurden bei den "ghosts" zusätzlich das periphere Protein der Innenseite, nämlich Spektrin, sowie die Bande 3, die ein hydrophiles zytoplasmatisches Segment besitzt (112,113), markiert. Da die "ghosts" offen sind, und die Innenseite daher frei zugänglich ist, kann die quartäre Verbindung auch mit der Innenseite reagieren.

Die Unterschiede zwischen tertiären und quartären Phenothiazinderivaten können dann folgendermaßen zusammengefaßt werden:

tertiäre Verbindungen lösen sich in der Membran, sie reagieren mit integralen Proteinen und Phospholipiden. Die Reaktion mit Spektrin und dem Zytoplasma bei intakten Erythrozyten ist vermutlich auf Sulfoxidbildung zurückzuführen.

Quartäre Verbindungen reagieren mit Membranbestandteilen von der Außenseite, bei intakten Erythrozyten nur mit Phospholipiden, bei den "ghosts" zusätzlich an der Innenseite mit Spektrin und dem

zytoplasmatischen Segment der integralen Proteine.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen, die eine Löslichkeit der tertiären Phenothiazinderivate in der Membran nachweisen, steht die Arbeit von Conrad und Singer (31,84). Diese Autoren entwickelten eine Filtrationsmethode, die auf einer Desorption des Chlorpromazins von Zellen ohne mechanische Krafteinwirkung ("hygroskopische Desorptionsmethode") beruht.
Unter diesen Bedingungen konnte keine Bindung von Chlorpromazin und Chlorpromazinmethojodid an Erythrozyten, bzw. "ghosts" nachgewiesen werden. Dies wurde durch den "hohen Innendruck" von biologischen Membranen, bedingt durch die Proteine, erklärt (84,101), der amphiphile Substanzen vom hydrophoben Inneren der Membran ausschließt. Dagegen fanden sie bei Phospholipidvesikeln, die einen deutlich geringeren Innendruck besitzen, eine Bindung beider Substanzen. Conrad und Singer vermuten, daß im Gegensatz zu Membranen mit Proteinen in reinen Vesikeln (86) eine echte Solubilisierung von Chlorpromazin und Chlorpromazinmethojodid vorliegt. In der vorliegenden Arbeit dagegen konnte gezeigt werden, daß die tertiären Phenothiazine auch in biologischen Membranen löslich sind.
Die Ergebnisse von Conrad und Singer sind vermutlich damit zu erklären, daß die Autoren mit einer Chlorpromazinkonzentration arbeiteten, die bereits membranschädigende Effekte besitzt. Bondy und Remien (65) konnten mit derselben Methode (HDM) zeigen, daß geringere Chlorpromazinkonzentrationen durchaus an Erythrozyten und Erythrozytenghosts binden.

4. Wie können die unterschiedlichen Bindungsorte der Phenothiazinderivate im Hinblick auf die Gestaltänderung der Erythrozyten interpretiert werden?

Die Hypothese von Sheetz und Singer (siehe Einleitung Seite 4-5) erklärt die Effekte der quartären Derivate (Echinozytenbildung) damit, daß sich diese Verbindungen in die äußere Hälfte der Lipiddoppelschicht einlagern und daher eine Ausdehnung hervorrufen. Mit dieser Hypothese sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vereinbar. Überraschend war allerdings, daß die hydrophoben Seiten der integralen Proteine durch die quartären Verbindungen nicht markiert waren. Dies könnte auch eine Wechselwirkung der quartären Phenothiazinderivate mit der Membranaußenseite bedeuten, ohne daß diese Verbindungen in die Membran eintauchen.
Die Stomatozytenbildung durch tertiäre Phenothiazine läßt sich aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht so einfach erklären wie die Echinozytenbildung. Sheetz und Singer vermuten, daß die Stomatozytenbildung mit einer Einlagerung der tertiären Derivate in die innere Hälfte der Lipiddoppelschicht hervorgerufen wird, die eine Ausdehnung der inneren Membranhälfte zur Folge hat. Aufgrund der durch Photoaffinitätsmarkierung mit den tertiären Derivaten erhaltenen Ergebnissen, muß es aber offen bleiben, ob die Stomatozytenbildung durch Bindung an die hydrophoben Seiten der Membranproteine oder durch einfache Einlagerung der Derivate in die Lipidschicht hervorgerufen wird. Eine Einlagerung der Phenothiazine in die innere Hälfte der Membran ohne an Proteine zu binden, wie die Hypothese von Sheetz und Singer (30) fordert, scheint aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht sehr wahrscheinlich.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann zusammenfassend gesagt werden:

- Verbindungen, die sich in der Membran lösen, erzeugen Stomatozyten.

- Echinozyten werden von Verbindungen erzeugt, die sich an der Membranaußenseite befinden.

E. Experimenteller Teil

E.1. Geräte und Material

E.1.1. Geräte

Zentrifugen: Ultrazentrifuge L3-50 der Firma Beckmann,
MSE High Speed 18,
Microfuge 3200 der Firma Eppendorf und
Laborfuge der Firma Christ

Infrarot-Spektrometer: IR. 20 A der Firma Beckmann

Zeiss-System Photometer: PMQ 3

Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer: M4Q III

Potentiometerschreiber: Servogor S der Firma Metrawatt

Dünnschichtscanner II: LB 2722 der Firma Berthold

Scintillationszähler: Tricarb Liquid Scintillation
Spektrometer Modell 3255 der
Firma Packard

Zeiss-Photomikroskop II: Lichtmikroskop mit Phasen-
Interferrenz-Kontrast nach Nomarsky

Registrierendes Spektralphotometer DMR 10 der Firma Zeiss

Hochdruck-Quecksilberdampf-Strahler: HPK 125W/L der Firma
Philips (Max.366nm)

Gelapparatur nach Studier

Power Supply 2103 von LKB

Geltrocknungsapparat 2003 von LKB

E.1.2. Material

Radioaktive Verbindungen:
Bei NEN Chemicals wurde [^{3}H-] Chlorpromazin (spez. Aktivität: 42 Ci/Mol) gekauft;
von D.B. Wildenauer wurden [^{14}C] 7-Azido-2-triflupromazin-methojodid (spez. Aktivität: 11.6 Ci/Mol), [^{3}H] 10-Propyl-piperazinylethyl-2-trifluormethyl-7-azido-phenothiazin (spez. Aktivität: 100 Ci/Mol) und [^{3}H] 2-Trifluormethyl-10-(4-phenyl-azido-4'-acetamido-1-propyl)phenothiazin (spez. Aktivität: 42 Ci/mMol) synthetisiert (113).

Die für die Synthesen benötigten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt geliefert.
2-Chlor-5-nitroanilin (95%), Bromacetaldehyddiethyl-acetal, N-Formylpiperazin und 1-Piperazinopropanol wurden bei EGA Chemie gekauft.

SDS-PAGE: SDS wurde bei Bio-Rad; Acrylamid, Temed, Bis-methylenacrylamid und Ammoniumpersulfat bei Serva gekauft.

Soluene und Instagel wurden bei Packard,
Protosol, Biofluor und Econofluor bei NEN Chemicals gekauft.

EN-HANCE wurde von der Firma NEN Chemicals bezogen.

DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254}, DC-Alufolien Aluminiumoxid neutral Typ E F_{254} und Folin Ciocalteus Phenolreagenz, sowie alle anderen Reagenzien wurden von der Firma Merck geliefert

E.2. Erythrozyten

Frisches, menschliches Blut von gesunden Spendern wurde mit Natrium-EDTA-Lösung versetzt, um eine Koagulationsbildung zu vermeiden. Diese Suspension wurde sofort 10 Minuten lang bei 4°C und 2500 x g max. zentrifugiert. Das Plasma und die dünne, hauptsächlich Leukozyten enthaltene Schicht, die sich direkt über der Erythrozytenschicht befindet, wurden dadurch abgetrennt. Die Erythrozyten wurden dreimal mit PBS (150 mM NaCl; 5 mM Phosphat; pH 7.4) gewaschen.

E.3. "ghost"-Präparation

Frische, gewaschene Erythrozyten wurden nach der Methode von Steck und Kant (60) hämolysiert. Die Erythrozyten wurden mit 40-fachem Volumen 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.0 versetzt und 20 Minuten lang bei 4°C und 22 000 x g max. zentrifugiert. Das Hämolysat wurde abgesaugt und die "ghosts" nach Zugabe desselben Puffers unter denselben Bedingungen (4°C, 22 000 x g max., 20 Minuten) zentrifugiert. Insgesamt wurden die Erythrozytenmembrane viermal gewaschen ("unsealed ghosts"). Die "ghost"-Präparation wurde am selben Tag weiterverarbeitet.

E.4. Proteingehalt

Der Proteingehalt wurde nach folgender modifizierter Lowry-Methode bestimmt:

Lowry:

Lösung A enthält: 2% $Na_2 CO_3$, 0,4% Na OH, 0,16% Natriumtartrat und 1% SDS.

Lösung B enthält: 4% $CuSo_4 x 5\ H_2O$
Folin-Ciocalteus Phenol Reagenz wurde auf 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt.
Methode: 100 Teile von Lösung A wurden mit 1 Teil von Lösung B gemischt. Diese Mischung gibt Reagenz C, ein alkalisches Kupfer Reagenz.
Proben von 1 ml Volumen, in denen 10-100 µg Protein enthalten waren, wurden zu 3 ml Reagenz C gegeben und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubiert. Diese Proben wurden dann mit 0,3 ml verdünntem Phenol-Reagenz gut gemischt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Gehalt an Protein wurde durch Absorptionsmessung der Proben bei 660 nm bestimmt.
Als Standard wurde Rinder Serum Albumin verwendet.

E.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (62)

E.5.1. Herstellung der Gele

E.5.1.1. Trenngel

Die Trenngele hatten unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen (6%, 7,5% und 10%). Entsprechende Volumina wurden von einer Stammlösung mit 30% Acrylamid und 0,8% N,N'-Bis-methylen-acrylamid entnommen. Die Endkonzentrationen des Trenngeles waren 0,375 M Tris-HCl, pH 6,8 und 0,1% SDS. Dann wurde Tetramethyläthylendiamin (0,025%) (Temed) zugesetzt und mit Ammoniumpersulfat (0,025%) die Polymerisation gestartet. Das flüßige Trenngel wurde zwischen 2 abgedichtete Glasplatten gegossen und vorsichtig mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um ein Austrocknen der Oberschicht zu vermeiden. Bei Raumtemperatur polymerisierte das Trenngel innerhalb von eineinhalb Stunden.

E.5.1.2. Sammelgel

Das Sammelgel enthielt 5% Acrylamid; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% Temed und 0,025% Ammoniumpersulfat. Das flüßige Sammelgel wurde auf das polymerisierte Trenngel, von dem der Isobutylalkohol vorher gut abgewaschen worden war, geschichtet. Ein Kamm mit 12 Zähnen wurde in das flüßige Sammelgel gesteckt, so daß keine Luftblasen unter den Zähnen entstanden. Das Sammelgel polymerisierte bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde.
Die Elektrophorese wurde in einer Apparatur nach Studier (63) durchgeführt. Das obere und untere Reservoir dieses Apparates wurde mit Elektrodenpuffer, der 0,025 M Tris-HCl, 0,129 M Glycin, pH 8,3; und 0,1% SDS enthielt, aufgefüllt. Das mit Proben beladene Gel wurde bei 30 -35 mA/pro Gel in sechs Stunden bei 0°C entwickelt.

E.5.2. Präparation der Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Membranen wurden durch hypotone Hämolyse von intakten Erythrozyten in 40-fachem Volumen von 5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 gewonnen (wie unter E.3.) und anschließend mit dem Solubilisierungspuffer auf 1:1 verdünnt. Der Solubilisierungspuffer enthielt 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerol und 5% 2-Mercaptoethanol. Das vorher verdünnte Hämolysat wurde mit dem Solubilisierungspuffer auf 1:1 verdünnt. Die Proben wurden 3 Minuten lang bei 95°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor sie abzentrifugiert wurden. Auf das Gel wurden zwischen 20 µg (ca. 10 µl) und 120 µg (60 µl) Protein jeder Probe aufgetragen. Die solubilisierten Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

E.5.3. Fixieren der Gele

Um die Proteinbanden in den Gelen zu fixieren, wurden sie in einer 25%-igen Isopropanol-10%-igen Essigsäurelösung 30 Minuten lang bewegt.

E.5.4. Färben der Gele mit Coomassie Blue

Die Färbelösung enthielt 0,1% Coomassie Brillant Blue, 25% Methanol und 10% Essigsäure. In dieser Lösung wurden die Gele 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt.

E.5.5. Entfärben der Gele

Die Gele wurden durch mehrmaliges Behandeln mit einer Mischung aus 5% Methanol, 7% Essigsäure und 88% Wasser entfärbt.

E.5.6. Trocknen der Gele

Die Gele wurden auf Filterpapier gelegt und in einem LKB-Trockenapparat bei 70°C 2 Stunden lang getrocknet.

E.5.7. Färben der Gele mit Schiffs Reagens

Kohlenhydrathaltige Proteine und Lipide, die durch Coomassie Blue nicht angefärbt wurden, konnten nach Oxidation mit Perjodsäure und anschließender Reaktion mit dem Schiff'schen Reagens sichtbar gemacht werden. Nach der Fixierung (30 Minuten lang in 12,5% Trichloressigsäure), wurde das Gel 50 Minuten in einer Lösung von 1% Perjodsäure und 3% Essigsäure leicht bewegt. Danach wurde gut mit Wasser nachgewaschen, bevor das Gel 50 Minuten im Dunkeln mit Schiffs Reagens behandelt wurde.

Anschließend wurde das Gel dreimal mit frisch bereiteter 0,5% Natriumdisulfidlösung 10 Minuten behandelt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde das Gel getrocknet, oder in 7% Essigsäure aufgehoben. Da die Methode nicht sehr empfindlich ist, war eine Proteinmenge von 80 - 100 µg pro Probe notwendig.

E.5.8. Autoradiographie

Die Gele von tritiummarkierten Verbindungen mußten wegen der geringen Strahlungsenergie des ^{3}H vorbehandelt werden, bevor eine Autoradiographie durchgeführt werden konnte. Nach der Färbung wurden die Gele eine halbe Stunde lang in EN-HANCE-Lösung bewegt und dann getrocknet. Gele von ^{14}C markierten Verbindungen wurden ohne diese Vorbehandlung getrocknet, da die stärkere Strahlungsenergie des ^{14}C für die Autoradiographie ausreichte. Die Gele wurden einem Kodak Röntgenfilm RP/R54 bei -70°C ausgesetzt. Der Film wurde nach 5-10 Tagen entwickelt. Die Entwicklungszeit war unterschiedlich,je nach verwendeter spez. Aktivität der radioaktiven Verbindung.

E.5.9. Bestimmung der Radioaktivität (107)

Aus den Gelen wurden die einzelnen vertikalen Probebahnen ausgeschnitten und in 3 mm Stücke horizontal unterteilt. Der Gehalt an Radioaktivität jeder einzelnen 3 mm Fraktion wurde folgendermaßen bestimmt: ^{14}C markierte Proben wurden über Nacht bei 37°C mit 10 ml Econofluor, 3% Protosol und 50 µl Essigsäure behandelt.
^{3}H markierte Gelteilchen wurden bei 37°C 4,5 Stunden lang mit 0,6 ml einer Lösung aus 18 ml 30% Wasserstoffperoxid, 1,18 ml 28,8% Ammoniak und 0,82 ml Wasser behandelt. Danach wurden 10ml Biofluor als Scintillationsflüssigkeit hinzugegeben. Die Radioaktivität wurde in einem Packard Tricarb Modell Nr. 3380 bestimmt.

E.5.10. Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der einzelnen Proteinbanden erfolgte mit einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer bei 540 nm Wellenlänge (Laufgeschwindigkeit 30 nm/sec.).

E.6. Gestaltänderung von menschlichen Erythrozyten

Zu einer Erythrozytensuspension mit einem Hämotokrit von 5 wurden steigende Phenothiazinkonzentrationen gegeben, deren Lösungen mit gepufferter Kochsalzlösung (0,15 M Natriumphosphat) isotonisch gemacht worden waren. Diese Suspension mit nunmehr einem Hämotokrit zwischen 3 und 5 wurden bei Raumtemperatur 5± 2 Minuten inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten in einem Lichtmikroskop vor und nach der Fixierung mit Glutaraldehyd (3% in Methanol) betrachtet. Als Kontrollösung diente eine 5%ige Erythrozytensuspension ohne Pharmakonzugabe. Es wurde der Konzentrationsbereich bestimmt, in dem 80% ± 10% der Erythrozyten von 10 µl Erythrozytensuspension (HK 3-5) als Stomatozyten bzw. Echinozyten vorlagen.

E.7. Bestimmung der osmotischen Resistenz

E.7.1. Bestimmung der Natriumchloridkonzentration, die 50% Hämolyse verursacht

Von einer 5%igen Erythrozytensuspension wurden jeweils 66µl zu 1000 µl phosphatgepufferten (0,15 M Natriumphosphat) Salzlösungen gegeben, die steigende Natriumchloridkonzentrationen enthielten. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben abzentrifugiert, im Überstand die Absorption bei 540 nm mit Hilfe eines Zeiss-Spektralphotometers

gemessen und der Hämolysegrad daraus berechnet. Es wurde die Natriumchloridkonzentration ermittelt, bei der 50% Hämolyse auftrat. Als Bezugswert diente ein 100% Hämolysewert, der bei 1000 µl Aqua dest. mit 66 µl Erythrozytensuspension (HK 5) auftrat.

E.7.2. Bestimmung der relativen Hämolyserate

Steigende Phenothiazinkonzentrationen wurden mit hypotoner Salzlösung, die 50% $\pm$ 20 % Hämolyse verursacht (6.1.), auf 1000 µl aufgefüllt. Danach wurden jeweils 66 µl von einer Erythrozytensuspension HK 5 hinzupipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Hämolysegrad durch Absorptionsmessung des Hämoglobins im Überstand bei 540 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer ermittelt.

E.8. Photolyseversuche

E.8.1. Intakte Erythrozyten

Erythrozyten nach E.2. wurden im Puffer suspendiert (HK 10) und 30 Minuten bei 0°C mit N_2 - Gas behandelt. Verschiedene Phenothiazinkonzentrationen wurden hinzugegeben. Anschließend wurden diese Suspensionen 15 Minuten bei 0°C unter Stickstoffatmosphäre equilibriert. Dann wurde der Kontrollwert (= 0-Wert) entnommen. Der Rest der Suspension wurde bei 0°C und unter schwachem Rühren mit einer Quecksilberhochdrucklampe (HPK) bestrahlt.Der Bestrahlungsabstand war 10 cm. Nach verschiedenen Bestrahlungszeiten wurden Proben entnommen und bei 2500 x g max., 0°C, 10 Minuten zentrifugiert. Um die nicht kovalent gebundenen Photolyseprodukte zu entfernen, wurden die

Erythrozyten anschließend dreimal mit eiskaltem Puffer gewaschen (150 mM NaCl, 5 mM Phosphat pH 7,4, 1% Rinder Serum Albumin). Dann wurden die Erythrozyten noch zweimal mit albuminfreiem Puffer gewaschen und in 40 Volumen 5 P 8 (5 mM Phosphat pH 8,0) hämolysiert. Die Membranen wurden durch Zentrifugation bei 22.000 x g max., 20 Minuten, 0°C vom Hämolysat abgetrennt. Die "ghosts" wurden noch dreimal mit 5 P 8 (5 mM Phosphat pH 8,0) gewaschen.
Radioaktivität wurde durch Entnahme von Proben bestimmt:
1. nach dem Equilibrieren,
2. im Kontrollwert,
3. im Überstand,
4. im Waschpuffer,
5. im Hämolysat und
6. in den "ghosts".

Gefärbte Proben wurden durch Zugabe von 0,5 ml 30% Wasserstoffperoxid entfärbt. Zu dieser Mischung wurde 1 ml Soluene 350 / Isopropanol 1:1 gegeben und 30 Minuten geschüttelt. Instagel (10 ml) diente als Scintillationsflüssigkeit. Nicht gefärbte Proben wurden mit 50 µl Essigsäure, 500 µl Protosol gemischt und eine Stunde bei 60°C inkubiert. Econofluor (10 ml) diente als Scintillationsflüssigkeit. Die Membranen wurden wie in E.5.2. beschrieben, solubilisiert und der SDS PAGE (E.5.) unterworfen.

E.8.2. Isolierte Erythrozytenmembrane ("ghosts")

Menschliche Erythrozyten wurden wie unter E.3. beschrieben, präpariert und in 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 suspendiert. Für die Ghostversuche wurden Proteinmengen wie bei den Erythrozytenversuchen eingesetzt. Die Ghostsuspension wurde 30 Minuten bei 0°C mit Stickstoff behandelt. Verschiedene Phenothiazinkonzentrationen wurden hinzugegeben. Dann wurde 15 Minuten unter Stickstoffatmosphäre equilibriert, und anschließend der Kontrollwert (= 0 - Wert) entnommen.

Der Rest der Suspension wurde wie in E.8.1. beschrieben photolysiert. Nach verschiedenen Bestrahlungszeiten wurden Proben entnommen. Sie wurden bei 22.000 x g max., 0°C, 20 Minuten zentrifugiert. Die "ghosts" wurden zweimal mit eiskaltem 5 P 8 + 1% Albumin (5 mM Phosphat pH 8,0 + 1% Rinder Serum Albumin) und dreimal mit 5 P 8 (5 mM Phosphat pH 8,0) gewaschen.
Radioaktivität wurde durch Entnahme von Proben bestimmt:
1. nach dem Equilibrieren,
2. im Überstand,
3. im Waschpuffer und
4. in den "ghosts".
Die Membranen wurden wie in E.5.2. beschrieben solubilisiert und der SDS-PAGE (E.5.) unterworfen.

E.9. Lipidextraktion der Erythrozyten nach Rose und Ohlander (64)

1 ml gewaschene Erythrozyten wurden mit 1 ml destilliertem Wasser in ein 20 ml Reagenzglas gegeben, und dieses wurde mit einem Teflonstopfen verschlossen. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 11 ml Isopropylalkohol langsam untergemischt. Die Zellen wurden dunkelrot und koagulierten. Nach einer Stunde bei gelegentlichem Umschütteln wurden 7 ml Chloroform hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde bei 500 x g max. zentrifugiert und der Überstand, in dem die Lipide gelöst waren, entnommen. Das Lösungsmittel wurde evaporiert, und die Lipide wurden mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

E.9.1. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Kieselgelplatten Merck (ohne Fluoreszenzindikator)
Kieselgel 60.

Laufmittel der 1. Laufrichtung

Chloroform 65 / Methanol 35 / Ammoniak 28% 5.

Laufmittel der 2. Laufrichtung

Chloroform 5 / Aceton 2 / Methanol 1 / Essigsäure 1 / Wasser 0,5.

E.9.2. Detektion der Lipide auf der Kieselgelplatte

Joddampf (neutrale Lipide, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Spingomyelin)
0,1% alkohol. Ninhydrinlösung (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin).
Radioaktivität wurde mittels eines Dünnschichtscanners ermittelt.

E.10. Synthesen

I Bis -(2-nitro-4-trifluormethylphenyl)disulfid M.W.444 0g (41)

Eine heiße Lösung von 34,5 g Na_2S x 9 H_2O und 4,5 g Schwefel in 300 ml Ethanol wurde zu einer unter Rückfluß kochenden Lösung von 62,0 g (0,3 Mol) 3-Nitro-4-chlorbenzoltrifluorid in 86 ml Ethanol gegeben. Die Mischung wurde drei Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen schied sich als Produkt ein gelber Niederschlag ab.
Ausbeute: 66,0 g (= 54%), Lit. (70%) gelbe Kristalle
Smp. 160°C - 162°C (Ethanol), Lit. 161°C - 162°C
I.R.-Spektrum: 1620 cm^{-1} (Aromaten);
1520 cm^{-1} und 1330 cm^{-1} (NO_2);
1250 cm^{-1}, 1150 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} (CF_3).

II Zinksalz von 5-Trifluormethyl-2-mercaptoanilin M.W.449 0g (41)

129,0 g (0,3 Mol) von Bis-(2-nitro-4-trifluormethylphenyl)disulfid (I) in 840 ml konz. Essigsäure wurden mit 232,2 g Zinkstaub und 580 ml konz. Salzsäure eine Stunde lang unter Rühren reduziert. Anschließend wurde die Aufschlämmung filtriert und das Filtrat mit Wasser verdünnt. Dann wurde mit Natriumacetat neutralisiert. Nach längerem Stehenlassen bildete sich ein weißes Zinkmercaptid. Dieses wurde unter Vakuum im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 110,0 g (= 85%), Lit. (= 94%)
I.R.-Spektrum (KBr): 3420 cm^{-1} und 3340 cm^{-1} (NH_2);
3060 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1610 cm^{-1} (Aromaten);
1180 cm^{-1}, 1120 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} (CF_3).

III 2-Amino-4-(trifluormethyl)-2',4' -dinitrodiphenyl-sulfid M.W. 359,0 g (40)

Bei Raumtemperatur und unter Stickstoffatmosphäre wurde eine Aufschlämmung von 50,0 g des Zinksalzes von 2-Amino-4-trifluormethylbenzylthiol (II) in 488 ml Methanol mit einer Lösung aus 13,2 g Natriummethylat und 122 ml Methanol versetzt. Die Lösung des oben gebildeten Natriumsalzes wurde zu einer Lösung von 46,0 g 2,4-Dinitrochlorbenzol in 50 ml Methanol gegeben und eine halbe Stunde lang unter Rückfluß in einer Stickstoffatmosphäre erhitzt. Zur heißen Lösung wurden 300 ml Wasser gegeben. Nach dem Erkalten bildeten sich gelbe Kristalle von 2-Amino-4-(trifluormethyl)-2',4'- dinitrodiphenylsulfid.
Ausbeute: 34,0 g (= 79%), Lit. (85%).
Smp. 173°C - 175°C, Lit. 170°C - 175°C.
Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol wurde der Schmelzpunkt auf 182 - 184°C, Lit. 180 - 183°C erhöht.
I.R.-Spektrum (KBr): 3480 cm^{-1} und 3380 cm^{-1} (NH);
1620 cm^{-1} (Aromaten);
1540 cm^{-1} und 1360 cm^{-1} (NO_2);
1280 cm^{-1}, 1150 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} (CF_3).

IV 2-Formamido-4-(trifluormethyl)-2',4' -dinitrodiphenyl-sulfid M.W. 401,0 g (40)

100,0 g 2-Amino-4-(trifluormethyl)-2',4' -dinitrodiphenylsulfid (III) wurden in 1 l 90%iger Ameisensäure eine Stunde lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung wurden 2,3 l H_2O hinzugefügt. Es bildeten sich gelbe Kristalle von 2- Formamido-4-(trifluormethyl)-2',4'-dinitrodiphenylsulfid.
Ausbeute: 77,0 g (= 69%), Lit. (90%).
Smp. 168°C - 171°C, Lit. 168°C - 170°C.

Nach dem Umkristallisieren aus Chloroform wurde der Schmelzpunkt auf 171°C - 173°C, Lit. 172°C - 174°C erhöht.
I.R.-Spektrum (KBr): 3360 cm^{-1} (NH);
3100 cm^{-1} (CH-aromatisch);
2900 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1700 cm^{-1} (C=O).

V 7-Nitro-2-(trifluormethyl)phenothiazin M.W. 312,0 g (40).

27,0 g von 2-Formamido-4-(trifluormethyl)-2', 4'-dinitrodiphenylsulfid (IV) in 270 ml getrocknetem Aceton, wurden mit 71,0 ml in ethanolischer Natronlauge versetzt. Diese Mischung wurde 45 Minuten lang unter Rückfluß und unter einer Stickstoffatmosphäre erhitzt. Zugabe von 285 ml warmem Wasser erzeugte einen Niederschlag dunkelroter Kristalle von 7-Nitro-2-(trifluormethyl)-phenothiazin.
Ausbeute: 20,0 g (= 95%), Lit. (85%)
Smp. 200°C - 205°C, Lit. 205°C - 210°C.
UV-Spektrum: (Methanol, Konz. 0,5 mg / 100 ml):
$\lambda_{max.}$ 247 nm, $\lambda_{max.}$ 227 nm, $\lambda_{max.}$ 305 nm.

I.R. Spektrum (KBr): 3380 cm^{-1} (NH);
1610 cm^{-1} (Aromaten);
1470 cm^{-1} (NO_2) und 1300 cm^{-1} (breit) (NO_2);
1250 cm^{-1}, 1150 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} (CF_3).

^{1}H-NMR-Spektrum (d_4-Methanol):
H (1) 6,83 ppm Singulett
H (2) 6,98 ppm Dublett
H (3) 7.07 ppm Dublett
H (4) 7,71 ppm Dublett
H (5) 7,84 ppm Quartett
H (6) 6,61 ppm Dublett

Kopplungskonstanten: J (2,3) = 8,5 Hz
J (4,5) = 2,7 Hz
J (5,6) = 8,7 Hz

N —— H N —— D (keine Protonenresonanz).

VI 10- (3-Dimethylaminopropyl)-7-nitro-2-trifluormethyl-phenothiazin M.W. 397,0 g (40).

Äquimolare Mengen von Natriumamid 3,75 g und 3-Dimethyl-aminopropylchlorid 11,63 g in 50 ml Diethylenglykoldimethylether wurden zu 20,0 g 7-Nitro-2-(trifluormethyl)phenothiazin (V) in 50 ml Diethylenglykoldimethylether gegeben und bei 135°C zwei Stunden lang unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde filtriert und mit HCl-Gas behandelt. Es bildete sich ein dunkler Niederschlag von 10-(3-Dimethylaminopropyl) -7-nitro-2-trifluormethylphenothiazin Hydrochlorid. Der Niederschlag wurde mehrmals aus Ethanol umkristallisiert.
Ausbeute: 17,0 g (= 67%), Lit. (85%)
Smp.: 240°C - 241°C, Lit. 235°C - 240°C (Zersetzung).
UV-Spektrum (Methanol, Konz. 0,5 mg / 100 ml):
λ_{max} 247 nm, λ_{max} 274 nm, λ_{max} 307 nm.

I.R.-Spektrum (KBr): 3400 cm^{-1} (breit, tert. Amin);
2880 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1650 cm^{-1} (Aromaten);
1480 cm^{-1} und 1320 cm^{-1} (NO_2).

VII 7-Amino-10-(3-Dimethylaminopropyl)-2-trifluormethyl-phenothiazin M.W. 367,0 g

Reduktion aromatischer Nitroverbindungen zu primären Aminen: (90,91)

1,0 g Nitroverbindung (7-Nitro-2-(trifluormethyl)-10-(3'-Dimethyl-aminopropyl)-phenothiazin (VI) wurden in 20 ml 75%igem Ethanol gelöst.

Dann wurden 3,0 Zinkgranula und 16 ml halbkonzentrierte Salzsäure langsam hinzugegeben. Die Mischung wurde zwei Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde diese Suspension mit Natronlauge auf pH 10 gebracht und filtriert. Das alkalische Filtrat wurde mit Salzsäure wieder neutralisiert. Diese gebildete Aminoverbindung wurde ohne vorherige Isolierung weiterverarbeitet. Charakterisierung mittels ^{1}H-NMR-Spektrum (d_4Methanol):

H (1-6)	7,25-7,35	ppm
H (7)	4,16	ppm Triplett
H (8)	2,23	ppm Quintett
H (9)	3,2	ppm Triplett
H (10)	2,83	ppm Singulett

Kopplungskonstante: J (7,8) = 6,8 Hz.

VIII 7-Azido-10-(3'-Dimethylaminopropyl)-2-trifluormethyl-phenothiazin M.W. 393,0 g

Die folgenden Arbeiten wurden unter Lichtausschluß durchgeführt.

Diazotierung:

Zu dem Rückstand von VII wurden 4,8 ml 2 N Salzsäure gegeben. Diese Mischung wurde auf 0°C abgekühlt. Tropfenweise wurden innerhalb von 30 Minuten unter Rühren 0,16 g $NaNO_2$ in 800 µl/H_2O hinzugegeben, und die Lösung wurde weitere 30 Minuten gerührt.

Azidherstellung:

Zur obigen Lösung wurden 350 mg Lithiumazid, das in wenig Ethanol gelöst war, innerhalb von 15 Minuten zugegeben. Die Mischung wurde anschließend eine Stunde bei 0°C und dann eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wurde mit konz. Natronlauge alkalisch gemacht. Der Alkohol wurde abdestilliert und der wässrige Rückstand mehrmals mit Benzol ausgeschüttelt. Die Benzolphase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Kaliumcarbonat getrocknet und dann wurde das Benzol abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Elutionsmittel gelöst, (Benzol 80 / Ether 20) und mit einer Al_2O_3-Säule (Aktivitätsstufe II) (30 cm x 2 cm) gereinigt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in wenig wasserfreiem Ether gelöst. Anschließend wurde das Salz mit etherischer Salzsäure gefällt und aus Xylol umkristallisiert.

Ausbeute: 500 mg (= 54%)

I.R.-Spektrum: (ölige Base auf NaCl-Platten)

2800 cm^{-1} (breit, OH-aromatisch);
2100 cm^{-1} (N_3).

UV-Spektrum: (Methanol, Konz. 1 mg / 100 ml):

$\lambda_{max.}$ 265 nm und $\lambda_{max.}$ 315 nm.

^{1}H-NMR-Spektrum (d_4-Methanol):

H (1-3)	7,2 - 7,4	ppm
H (4-6)	6,9 - 7,2	ppm
H (7)	4,11	ppm Triplett
H (8)	2,15	ppm Quintett
H (9)	3,2	ppm Triplett
H (10)	2,81	ppm Singulett

Kopplungskonstante: J (7,8) = 6,5 Hz.

IX 7-Azido-2-triflupromazinmethojodid (42,43)

Aus 0,5 g 7-Azidotriflupromazinhydrochlorid (VIII) wurde mit Na_2CO_3 die Base freigesetzt und in Ether aufgenommen. Die Etherextrakte wurden mit K_2CO_3 getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert. Zu 0,45 g der freien Base in Aceton wurden 0,2 g Methyljodid gegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Mischung wurde Ether bis zu einer dauerhaften Trübung hinzugegeben. Es bildeten sich nach einiger Zeit weiße Kristalle, die aus Ether / Aceton umkristalliert wurden.

Ausbeute: 0,3 g (= 60%), Lit. (60%)

Smp.: 169°C - 170°C, Lit. 169°C - 170°C

Rf: 0,8, Lit. 0,81

UV-Spektrum: (0,1 N HCl, Konz. 5 mg / 100 ml)

$\lambda_{max.}$ 262 nm, $\lambda_{max.}$ 310 nm.

I.R.-Spektrum (KBr): 3500-3400 cm^{-1} (breit, N-tert.):
3000 cm^{-1} (CH-aromatisch);
2100 cm^{-1} (N_3);
1620 cm^{-1} (Aromaten.

^{1}H-NMR-Spektrum: (d_4-Methanol)

H (1-3)	7,2-7,4	ppm
H (4-6)	6,9-7,2	ppm
H (7)	4,13	ppm Triplett
H (8)	2,2	ppm Quintett
H (9)	3,5	ppm Triplett
H (10)	3,06	ppm Singulett

Kopplungskonstante: J (7,8) = 6,2 Hz.

X 10-(3'-Chloropropyl)-7-nitrophenothiazin M.W. 388,0 g (44)

Zu einer Lösung von 2-Trifluormethyl-7-nitrophenothiazin (V) in 60 ml wasserfreiem Toluol wurden 1,2 g Natriumamid in 10 ml Toluol gegeben, und die Reaktionsmischung wurde auf 90°C erhitzt. In einem Zeitraum von zwei Stunden wurden tropfenweise 3,2 g Chlorpropylbromid in wenig Toluol hinzugefügt. Diese Mischung wurde achtzehn Stunden lang bei 135°C unter Stickstoffatmosphäre am Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und auf 10 ml eingeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden über $CaCl_2$ getrocknet, dann wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Der rote ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Kieselsäule: (30 cm x 2 cm)
Elutionsmittel: Petrolether 70 / Chloroform 30
Ausbeute: 1,5 g (= 41%)
Smp.: 129°C - 130°C, dunkelrote Kristalle. Die Kristalle wurden dreimal aus Isopropanol umkristallisiert.

^{1}H-NMR-Spektrum: ($CDCL_3$)

H (1)	7,138 ppm	Singulett
H (2,3)	7,255 ppm	Singulett
H (4)	8,02 ppm	Singulett
H (5)	8,07 ppm	Dublett
H (6)	6,96 ppm	Dublett
H (7)	4,19 ppm	Triplett
H (8)	2,25 ppm	Quintett
H (9)	3,68 ppm	Triplett

Kopplungskonstanten: J (5,6) = 8,8 Hz
J (7,8) = 6,6 Hz
J (8,9) = 5,9 Hz.

XI 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-(3-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylpropyl)phenothiazin M.W. 482,0 g (44)

510 mg 10-Chloropropyl-2-trifluormethyl-7-nitrophenothiazin (X), 360 mg Piperazinoethanol und 220 mg Natriumjodid wurden in 7 ml wasserfreiem Methylethyketon über Nacht unter Stickstoffatmosphäre und unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde alkalisch gemacht und mehrmals mit Ether ausgeschüttelt. In die getrockneten Etherextrakte wurde HCl-Gas eingeleitet. Es bildete sich ein dunkelroter Niederschlag.

Ausbeute: 500 mg (= 80%)
Die dunkelroten Kristalle wurden aus Isopropanol dreimal umkristallisiert.

I.R.-Spektrum: 3520-3400 cm^{-1} (OH);
2940 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1700 cm^{-1} (Aromaten);
1460 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} (NO_2).

XII 10-Propylpiperazinylethyl-2-trifluormethyl-7-azidophenothiazin M.W. 478,0 g (44)

Reduktion:

200 mg 10-Propylpiperazinylethyl-2-trifluormethyl-7-nitrophenothiazin (XI) Hydrochlorid wurden mit 640 mg reduziertem Eisenpulver in zwei Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde alkalisch gemacht und filtriert. Der Filter wurde mehrmals mit 75%igem Ethanol nachgespült.

Folgende Schritte wurden unter Lichtausschluß durchgeführt.

Diazotierung:

Das Filtrat wurde mit konz. Salzsäure auf pH 6,0 gebracht und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 6 ml 2N Salzsäure wurde tropfenweise mit 200 mg $NaNO_2$ in 1,2 ml Wasser diazotiert. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde der Überschuß an salpetriger Säure durch Zugabe von wenig Harnstoff zersetzt.

Herstellung des Phenothiazinazides:

Zu dem Diazoniumsalz wurden tropfenweise während 30 Minuten 200 mg Lithiumazid in wenig Ethanol gegeben. Die Lösung wurde noch eine Stunde bei 0°C und eine weitere bei Raumtemperatur gerührt. Der Alkohol wurde abdestilliert und der wässrige Rückstand alkalisch gemacht. Die Lösung wurde mit Kaliumcarbonat gesättigt und mit Ether extrahiert. Nach dem Trocknen und Filtrieren der gesammelten Etherextrakte wurde das Lösungsmittel abdestilliert.
Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über eine Kieselgelsäule (20 cm x 1 cm). Als Elutionsmittel wurde Methanol verwendet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in wasserfreiem Ether aufgenommen. Auf Zugabe von etherischer Salzsäure bildete sich ein weißer Niederschlag, der abzentrifugiert und getrocknet wurde. Das gebildete HCl-Salz wurde aus Isopropanol dreimal umkristallisiert.

Ausbeute: 70 mg (= 36%)

I.R.-Spektrum: 3440-3380 cm^{-1} (OH);
2920-2960 cm^{-1} (CH-aromatisch);
2100 cm^{-1} (N_3).

^{1}H-NMR-Spektrum (d_4-Methanol):

H (1-6-)	6,9 -7,3	ppm
H (7)	4,14	ppm Triplett
H (8)	2,23	ppm Quintett
H (9) H (12)	3,3	ppm jeweils Triplett
H (10) H (11)	3,59	ppm Singulett
H (13)	3,9	ppm Triplett

XIII 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-propylpiperazin M.W. 438,0 g,

170 mg 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-chloropropylphenothiazin, 67 mg wasserfreies Formylpiperazin und 53 mg Natriumjodid wurden in 1,5 ml Methylethylketon achtzehn Stunden lang unter Rückfluß und unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert.

Abspaltung der Formylgruppe:

Der Rückstand wurde in 2,5 ml konz. Salzsäure, 17,7 ml Wasser und 6 ml Ether aufgenommen.Die Säureschicht wurde von der Etherschicht, die das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial enthielt, getrennt, mit Kaliumcarbonat gesättigt und fünfmal mit Ether extrahiert. Die Etherphase wurde getrocknet und das Salz mit etherischer Salzsäure gefällt. Der orangegelbe Niederschlag wurde zweimal aus Ethanol umkristallisiert.
Ausbeute: 140 mg (= 73%).

^{1}H-NMR-Spektrum (d_4-Methanol):

H (1)	7,138 ppm Singulett
H (2,3)	7,285 ppm Singulett
H (4)	8,02 ppm Singulett
H (5)	8,07 ppm Dublett
H (6)	6,96 ppm Dublett
H (7)	4,19 ppm Triplett
H (8)	2,25 ppm Quintett
H (9)	3,68 ppm Triplett

Kopplungskonstanten: J (5,6) = 8,8 Hz
J (7,8) = 6,6 Hz
J (8,9) = 5,9 Hz

XIV 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-ethylpiperazinylpropyl-phenothiazindiethylacetal M.W. 554,0 g

400 mg 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-propylpiperazin (XIII) als Base wurden in 5 ml Toluol gelöst. Dann wurden 0,6 g Bromacetaldehyddiethylacetal und 0,6 g Kaliumcarbonat hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand in H_2O aufgenommen. Die Lösung wurde alkalisch gemacht und mit Ether extrahiert.
Das Acetalderivat wurde säulenchromatographisch über Aluminiumoxyd (Aktivitätsstufe II) gereinigt.
Elutionsmittel: Methanol.
Ausbeute: 160 mg (= 32%)
I.R.-Spektrum (KBr): 3400 cm^{-1} (breit OH-Gruppe);
3000 cm^{-1} (N-tertiär);
2800 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1700 cm^{-1} (Aromaten);
1150 cm^{-1} und 1050 cm^{-1} (Acetal).

Abspaltung des Diethylacetals und Reduktion des gebildeten Formaldehyds mit Natriumborhydrid

XI 7-Nitro-2-trifluormethyl-10-propyl-(3-piperazinyl-) 2-hydroxyethyl)-phenothiazin M.W. 482,0 g

100 mg 2-Trifluormethyl-7-nitro-10-chloropropylpiperazin-diethylacetal wurden eine Stunde lang in konz. Salzsäure gerührt. Die Lösung wurde mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht und fünfmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde nach dem Trocknen abdestilliert und der Rückstand in wenig konz. Salzsäure gelöst. Danach wurde die überschüssige Salzsäure mit Stickstoff abgeblasen. Dieser Rückstand wurde in Isopropylalkohol unter Erwärmen gelöst und mit 30 mg Natriumborhydrid versetzt und zwei Stunden gerührt. Der Alkohol wurde abdestilliert und das gebildete 7-Nitro-2-trifluormethyl-propylpiperazinoethanol-phenothiazin mit präparativer Dünnschicht isoliert.

Kieselgelplatten Merck: Kieselgel 60 F_{254}

Elutionsmittel: Ethanol
Laufmittel: Methanol
Ausbeute: 56 mg (= 64%)
I.R.-Spektrum: 3520 - 3400 cm^{-1} (OH);
2940 cm^{-1} (CH-aromatisch);
1700 cm^{-1} (Aromaten);
1460 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} (NO_2).

Diese Substanz ist identisch mit der auf Seite 79

F. Zusammenfassung

Zum molekularen Wirkungsmechanismus der Phenothiazine bestehen folgende Vorstellungen:

a.) ihre neuroleptische Wirkung erfolgt durch Reaktion mit spezifischen Wirkorten, z.B. Dopaminrezeptoren;

b.) ihre sedativen und anaesthetischen Eigenschaften beruhen auf unspezifischen Membranwirkungen. Diese werden bevorzugt an Erythrozyten als Modell untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Phenothiazine kovalent an Erythrozyten zu binden, um damit Aussagen über ihre Bindungsstellen in biologischen Membranen zu erhalten.

1.) Die Empfindlichkeit von Chlorpromazin gegenüber Ultraviolett-Bestrahlung wurde benützt, um kovalente Bindungen mit Bestandteilen der Erythrozyten zu erzeugen. Der radikalische Mechanismus dieser Reaktion hatte lange Photolysezeiten, sowie relativ geringen und unspezifischen Einbau in Membran und Zytoplasma zur Folge.

2.) Phenothiazinderivate mit Azid-Substituenten wurden synthetisiert, die bei UV-Bestrahlung reaktive Nitrene bilden können:
2-Trifluoromethyl-7-azido-10-(3-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)propyl)phenothiazin (=7-Azidofluphenazin)
und
2-Trifluoromethyl-7-azido-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazin-methojodid (=7-Azidotriflupromazin methojodid).
Das Ausgangsmaterial, 7-Nitrophenothiazin wurde in einer Mehrstufensynthese nach Literaturangaben hergestellt. Die entsprechende Seitenkette wurde angefügt und die Azid-

verbindungen wurden durch Reduktion der Nitrogruppe zum Amin und anschließender Diazotierung und Ersatz der Diazogruppe durch das Azid erhalten. Zur Herstellung radioaktiv markierter Verbindungen wurden die Synthesewege erarbeitet.

3.) Die biologische Wirksamkeit der neu synthetisierten Phenothiazinazide wurde überprüft durch Bestimmung der Konzentrationen, die bei Erythrozyten Gestaltänderung, sowie Schutz vor osmotischer Hämolyse bewirken. Sie waren im selben Bereich wie die therapeutisch verwendeten Phenothiazine.

4.) Durch Photolyse (10 Minuten) der mit radioaktiv markierten Phenothiazinaziden behandelten Erythrozyten wurde 7-8% der Ausgangskonzentration in die Zellen eingebaut; der Einbau in isolierte Erythrozytenmembrane ("ghosts") betrug nach 5 Minuten Photolyse 15 - 20%.

5.) Die nach Photolyse von Erythrozyten, bzw. "ghosts" mit radioaktiven Phenothiazinaziden markierten Membranbestandteile wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert:

a.) 7-Azidofluphenazin:
In intakten Erythrozyten wurden die integralen Membranproteine Glycophorin, Bande 3, die Phospholipide und zu einem geringeren Prozentsatz Spektrin markiert. Ein Teil der Substanz wurde im Zytoplasma nachgewiesen.
In "ghosts" wurden nur die integralen Membranproteine Glycophorin und Bande 3 sowie die Phospholipide markiert.

b.) 7-Azidotriflupromazin methojodid:
In intakten Erythrozyten wurden ausschließlich die Phospholipide markiert.

In "ghosts" wurden die integralen Membranproteine Bande 3, Glycophorin, sowie das periphere Membranprotein Spektrin und die Phospholipide markiert.

6.) Durch Photolyse von intakten Erythrozyten bzw. "ghosts", die mit einem Phenothiazinderivat, das die Azidgruppe in der Seitenkette enthält, behandelt worden waren und durch Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, wie mit den in 7-Position des Phenothiazinringsystems substituierten Derivaten.

7.) Schlußfolgerungen:

a.) Tertiäre Phenothiazine lösen sich im hydrophoben Kern der Erythrozytenmembran.
Dies steht im Gegensatz zu einer Hypothese von Conrad und Singer (PNAS, 76, 5202 (1979), nach der amphiphile Verbindungen wie Chlorpromazin an der Außenseite der Membran wirken.

b.) Quartäre Phenothiazine wirken von der Membranaußenseite, sie dringen nicht in den Lipidkern der Membran ein.

c.) Stomatozyten werden von Verbindungen erzeugt, die sich im Inneren der Membran befinden,
Echinozyten durch Verbindungen, die sich überwiegend an der Membranaußenseite aufhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Goodman and Gilman's:
The pharmacological basis of therapeutics.
Sixth Edition, Macmillan Publishing Co., Inc.,
New York 1980, 319 - 447.

2. Charpentier Patent, Chem. Abstracts 49, P 3269 c (1955).

3. Delay, J. and Deniker, P.:
Trente-huit cas de psychoses traitées par la cure prolongée et continue de 4560 R.P.
Le Congrès des Al. et Neurol. de Langue Fr. In, Compte rendu du Congrès.
Masson et Cie, Paris, 1952.

4. Julien, R.M.:
A primer of drug action.
Second Edition. Freeman W.H. and Company, San Francisco,
1978, 121-135.

5. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie,
3. Auflage, Wissenschaftsverlag, Zürich 1980, 448-452.

6. Auterhoff, H.:
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 8. Auflage,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1976.

7. Ammon, H.P.T.:
Arzneimittelneben- und Wechselwirkungen.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1981.

8. Seeman, P.:
The membrane actions of anesthetics and tranquilizers.
Pharmacol. Rev. 24, 583-655 (1972).

9. Snyder, S.H., Banerjee, S.P., Yamamura, H.T. and Greenberg, D.:
"Drugs, neurotransmitters and schizophrenia",
Science 184, 1243-53, (1974).

10. Seeman, P.:
Brain dopamine receptors.
Pharmacol. Rev. 32, 229-313 (1981).

11. Bancroft, W.D. and Richter, G.H.:
The chemistry of anesthesia.
J. Phys. Chem., 35, 215-268 (1931).

12. Leake, C.D.:
Claude Bernard and anesthesia,
Anesthesiology 35, 112-113 (1971).

13. Antee, L. and Paasonen, M.K.:
Distribution of some phenothiazine in red blood cells
and platelets.
J. Pharm. Pharmacol. 18, 126-128 (1966).

14. Kwant, W. and Seeman, P.:
The membrane concentration of a local anesthetic
(chlorpromazine).
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 183, 530-543 (1969).

15. Seeman, P.:
Membrane stabilization by drugs: tranquilizers,
steroids and anesthetics.
Int. Rev. Neurobiol. 9, 145-221 (1966).

16. Seeman, P. and Weinstein, J.:
Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines.
Biochem. Pharmacol. 15, 1737-1752 (1966).

17. Seeman, P., Sanks, T., Argent, W. and Kwant, W.O.:
The effect of membrane strain - rate and of temperature on erythrocyte fragility and critical hemolytic volume.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 183, 476-489 (1969).

18. Marchesi, V.T.:
Functional proteins of the human red blood cell membrane.
Semin. Hemat. 16, 3-20 (1979).

19. Lux, S.E.:
Spectrin - actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cells.
Semin. Hemat. 16, 21 (1979).

20. Steck, T.L.:
The organization of proteins in the human red blood cell membrane.
J. Cell Biol. 62, 1-19 (1974).

21. Branton, D., Cohen, C.M., Tyler, J.:
Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane.
Cell, 24, 24-32 (1981).

22. Marchesi, V.T., Furthmayr, H.:
The red cell membrane.
Ann. Rev. Biochem., 667-698 (1976).

23. Seeman, P.:
Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers.
Biochem. Pharmacol. 15, 1753-1766 (1966).

24. Roth, S. and Seeman, P.:
The membrane concentrations of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the Meyer - Overton rule of anesthesia; negative narcotics do not.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 255, 207-219 (1972).

25. Skou, J.C.:
Local anesthetics VI. Relation between blocking potency and penetration of a monomolecular layer of lipids from nerves.
Acta pharmacol. toxicol. 10, 325-337 (1954).

26. Skou, J.C.:
Relation between the ability of various compounds to block nervous conduction and their penetration into a monomolecular layer of nerve - tissue lipoids.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 30, 179-189 (1972).

27. Machleidt, H., Roth, S. and Seeman, P.:
The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 225, 179-189 (1972).

28. Roth, S. and Seeman, P.:
Anesthetics expand erythrocyte membranes without causing loss of K^+.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 255, 190-198 (1972).

29. Seemann, P. and Kwant, W.O.:
Membrane expansion of the erythrocyte by both the neutral and ionized forms of chlorpromazine.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 183, 512-519 (1969).

30. Sheetz, M.P. and Singer, S.J.:
Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug erythrocyte interactions.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 71, 4457-4461 (1974).

31. Conrad, M.J. and Singer, S.J.:
The solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure.
Biochemistry (Wash.) 20, 808-818 (1981).

32. Knowles, J.R.:
Photogenerated reagents for biological receptor - site labeling.
Acc. Chem. Res. 5, 155-160.

33. Haley, B.E. and Hoffmann, J.F.:
Interactions of a photo-affinity ATP analog with cation - stimulated adenosine triphosphatases of human red cell membranes.
Pro. nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 3367-3371 (1974).

34. Staros, J.V. and Richards, F.M.:
Photochemical labeling of the surface proteins of human erythrocytes.
Biochemistry 13, 2720-2726 (1974).

35. Gloves, L.D., Cheng, E. and S.:
The interaction of hepatocyte plasma membranes with an azide derivate of procaine,
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 469, 194-201 (1977).

36. Gupta, C.M., Rhadhakrishnan, R. and Khorana, H.G.:
Glycerophospholipid synthesis:
Improved general method and new analogs containing photoactivable groups.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 74, 4315-4319 (1977).

37. Klip, A. and Gitler, C.:
Photoactive covalent labeling of membrane components from within the lipid core.
Biochem. biophys. Res. Commun. 60, 1155-1162 (1974).

38. Ben-Hur, E., Prager, A., Green, M. and Rosenthal, I.:
Ph-dependence of the phototoxic and photomutagenic effects of chlorpromazine.
Chem.-biol. Interact. 29, 223-233 (1980).

39. Staros, J.V.:
Aryl azide photolabels in biochemistry.
Trends in pharmacological Science ,12, 320-323 (1980).

40. Florey, K., Restivo, A.R.:
A new synthesis of 10-(3-dimethylaminopropyl)-2-(trifluormethyl)-phenothiazine hydrochloride and 7-substituted derivates.
J. org. Chem. 23, 1018-1021 (1958).

41. Kiprianov, A.I. and Yagupol'skiĭ, L.M. (Kiev State Univ.):
Cyanine dyes which contain fluorine. II. Cyanine dyes from derivatives of 5-fluoro- and 5-trifluoromethyl-benzothiazole.
Zhur. Obskch. Khim. 22, 2209-15 (1952); C.A. 46, 5467 e.

42. Huang, C.L. and Chang, C.T.:
Physical properties of quarternary ammonium salts of phenothiazine derivatives.
J. pharm. Sci. 12, 1895-1898 (1971).

43. Huang, C.L., Yeh, J.Z. and Muui, I.A.:
Comparative distribution, excretion and metabolism of ^{14}C-labeled quarternary ammonium compounds of promazine, chlorpromazine and triflupromazine.
J.pharm. Sci. 59, 1114-1118 (1970).

44. Bossle, P.C., Parker Ferguson, C., Sultan, W.E., Lennox,W.J., Dudley, G.E., Rea, T.H. and Miller, I.:
Synthesis and biological activity of new-2-substituted analogs of fluphenazine.
J. med. Chem. 19, 370-373 (1976).

45. Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki, M. and Kanaho, Y.:
Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells.
Biochem. Pharmacol. 28, 613-620 (1979).

46. Thoma, K. und Vasters, E.:
Photoinstabilität und Stabilisierung von Phenothiazinderivaten.
Pharmazeut. Zeitung 119, Jahrgang Nr. 40,
Oktober (1974).

47. Nemjeh, M. und Pilpel, N.:
The effect of the photodecomposition of chlorpromazine on lecithin monolayers.
J. Pharm. Pharmacol. 30, 748-753 (1978).

48. Felmeister, A. und Discher, C.A.:
Photodegradation of chlorpromazine hydrochloride.
J. Pharm. Sci. 53, 756-762 (1964).

49. Borg, D.C. und Cotzias, G.C.:
Interaction of trace metals with phenothiazine drug derivates, II.formation of free radicals.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 623-642 (1962).

50. Forrest, J.S., Forrest, F.M. u. Berger, M.:
Free radicals as metabolites of drugs derived from phenothiazine.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 29, 441 (1958).

51. Akera, T. and Brody, T.M.:
Inhibition of brain sodium- and potassium stimulated adenosine triphosphatase activity by chlorpromazine free radical.
Molec. Pharmacol. 4, 600-612 (1968).

52. Akera, T. and Brody, M.:
Effects of chlorpromazine free radical on brain microsomal enzymes.
Biochem. Pharmacol. 21, 1403-1411 (1972).

53. Wentrup, C.:
Reaktive Zwischenstufen I,
George Thieme Verlag, Stuttgart 1979.

54. Turro, N.J.:
Structure and dynamics of important reactive intermediates involved in photobiological systems.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 1-17 (1980).

55. Battersby, M.K., Richards, J.G. and Möhler, H.:
Benzodiazepine Receptor: Photoaffinity labeling and localization.
J. Pharmacol. 57, 277-278 (1979).

56. Brunner, J. and Semenza, G.:
Selective labeling of the hydrophobic core of membranes with 3-(trifluormethyl)-3-(m-(^{127}J)iodophenyl)diazirine, a carbene-generating reagent.
Biochemistry 20, 7174-7182 (1981).

57. Richards, F.M. and Brunner, J.:
General labeling of membrane proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 144-164 (1980).

58. Traficante, L.J., Sakalis, G., Siekiersky, J., Rotrosen, J. and Gershon, S.:
Rapid in vitro sulfoxidation of chlorpromazine by human blood: inhibition by an endogenous plasma protein factor.
Life Sci. 24, 337-346 (1979).

59. Pappalardo, G. and Scapini, G.:
Synthesis of some phenothiazine derivatives by transposition of substituted 2-chloro-4-nitro-2-acetamidodiphenylsulfides.
Chem. Abstr. 59, 13972e (1963).

60. Steck, T.L., Kant, J.A.:
Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicls from human erythrocyte membranes.
Meth. Enzymol. 31 A, 172-180 (1974).

61. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

62. Laemmli, U.K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4.

63. Studier, F.W.:
Analysis of bacteriophage T_7 early RNAs and proteins on slab gels.
J. molec. Biol. 79, 237-248 (1973).

64. Rose, H.G. and Ohlander, M.:
Improved procedure for the extracation of lipids from human erythrocytes.
J. Lipid Research 6, 428-431 (1965).

65. Bondy, B. and Remien, J.:
Differential binding of chlorpromazine to human blood cells:
Application of the hygroscopic desorption method.
Life Sci. 28, 441-449 (1980).

66. Brockhuyse, R.M.:
Improved lipid extraction of erythrocytes.
Clin. chim. Acta 51, 341-343 (1974).

67. Berovici, T. and Gitler, C.:
5-(^{125}J) Jodonaphtyl azide, a reagent to determine the penetration into the lipid bilayer of biological membranes.
Biochemistry 17, 1484-1489 (1978).

68. Akera, T. and Brody, T.M.:
The interaction between chlorpromazine free radical and microsomal sodium- and potassium - activated adenosine triphosphatase from rat brain.
Molec. Pharmacol. 5, 605-614 (1969).

69. Curatolo, W., Rhadhakrishnan, R.,Gupta, M.C. and Khorana, H.G.:
Photoactivatable carbene - generating phospholipids: Physical properties and use in detection of phase separations in lipid mixtures.
Biochemistry 20, 1374-1378 (1981).

70. Huang, C.L. and Sands, F.L.:
Effect of ultraviolet irradiation on chlorpromazine II.
J. pharm. Sci. 56, 259-264 (1967).

71. Hanahan, D.J.:
The erythrocyte membrane variability and membrane enzyme activity.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 300, 319-340 (1973).

72. Nodiff, E.A. and Hausmann, M.:
A new phenothiazine synthesis.
The halogen induced smiles rearrangement.
J. org. Chem. 29, 2453-2455 (1964).

73. Brandt, J., Liljas, L. and Andersson, L.O.:
Dye sensitized photochemical labeling of proteins in the erythrocyte membrane.
Biochem. biophys. Res. Commun. 93, 600-606 (1980).

74. Bayley, H. and Knowles, J.R.:
Photogenerated, hydrophobic reagents for intrinsic membrane proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 45-48 (1980).

75. Traglia De, M.C., Brand, J.S. and Tometsko, A.M.:
Application of light sensitive chemicals to probe protein structure and function.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 59 (1980).

76. Bayley, H. and Knowles, J.R.:
Photogenerated reagents for membrane labeling.
I. Phenylnitrene formed within the lipid bilayer.
Biochemistry 17, 2414-2419 (1978).

77. Bayley, H. and Knowles, J.R.:
Photogenerated reagents for membrane labeling.
2. Phenylcarbene and adamantylidene formed within the lipid bilayer.
Biochemistry 17, 2420-2423 (1978).

78. Premachandra, B.R., Kalra, V.K. and Baker, R.F.:
Photoaffinity labeling of procaine - binding sites in normal and sickle cell membranes.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 550, 245-258 (1979).

79. Gupta, M., Rhadhakrishnan, R., Gerber, G.E., Olsen, W.L., Quai, C. and Khorana, H.:
Intermolecular crosslinking of fatty acyl chains in phospholipids: Use of photoactivable carbene precursors.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76, 2595-2599 (1979).

80. Suda, T., Shimizu, D., Maeda, N. and Shiga, T.:
Decreased viscosity of human erythrocyte suspension induced by chlorpromazine and isoxsuprine.
Biochem. Pharmacol. 30, 2057-2064 (1981).

81. Hui, D.Y. and Harmony, J.A.K.:
Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes I.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 550, 407-424 (1979).

82. Hui, D.Y. and Harmony, J.A.K.:
Interaction of plasma lipoproteins with erythrocites.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 550, 425-434 (1979).

83. Westheimer, F.H.:
Photoaffinity labeling - retrospect and prospect.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 135-143 (1980).

84. Conrad, M.J. and Singer, S.J.:
Evidence for a large internal pressure in biological membranes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76, 5202-5206 (1979).

85. Klingenberg, M.:
Membrane protein oligomerie structure and transport function.
Nature 290, 449-454 (1981).

86. Schwendener, R.A. and Weder, H.G.:
The binding of chlorpromazine to bilayer liposomes. Evaluation of stoichiometric constants from equlibrium and steady state studies.
Biochem. Pharmacol. 27, 2721-2727 (1978).

87. Fehske, K.J., Müller, W.E. and Wollert, U.:
The location of drug binding sites in human serum albumin.
Biochem. Pharmacol. 30, 687-692 (1981).

88. Gennis, R.B.:
Protein lipid-interactions.
Ann. Rev. Biophys. Bioengng. 6, 195-238 (1977).

89. Lehninger, A.L.:
Biochemie.
Verlag Chemie, Weinheim (1975).

90. Bayer, H.:
Lehrbuch der organ. Chemie.
S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 1973.

91. Christen, H.R.:
Grundlagen der organischen Chemie.
Verlag Sauerländer, Aarau, 1975.

92. Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.

93. Caldwell, A.E.:
History of pharmacology.
Principles of psychopharmacology 2nd, ed. Academic Press, Inc. New York, 9-4 (1978).

94. Bodea, C. and Silberg, J.:
Recent advances in the chemistry of phenothiazines.
Academy of the R.S. Roumania, Cluj, 322-449.

95. Reiser, A. and Wagner, H.M.:
Photochemistry of the azido group. Patai: The chemistry of functional groups. The chemistry of the azido group.
Interscience Publisher, J. Wileg, Chapter 8, 442-498, London 1971.

96. Bayley, H. and Knowles, J.R.:
Photoaffinity labeling.
General Methodology, 69-115.

97. Gitler, C. and Berovici, T.:
Use of lipophilic photoactivable reagents to identify the lipid-embedded domains of membrane proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 346, 189-211 (1980).

98. Murthy, S.N.P., Liu, T., Kaul, R.K., Köhler, H. and Steck, T.L.:
The aldolase - binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH_2 terminus of band 3.
J.biol. Chem. 256, 11203-11208 (1981).

99. Appell, K.C. and Low, P.S.:
Partial structural characterization of the cytoplasmic domain of the erythrocyte membrane protein, band 3.
J. biol. Chem. 256, 11104-11111 (1981).

100. Kita, Y. and Miller, K.W.:
Partial molar volumes of some 1 - alkanols in erythrocyte ghosts and lipid bilayers.
Biochemistry 21, 2840-2847 (1982).

101. Gains, N. and Dawson, A.P.:
Evidence against protein - induced 'internal pressure' in biological membranes.
Biochem. J. 207, 567-572 (1982).

102. Weinstein, R.S., Khodadad,J.K. and Steck, T.L.:
The band 3 protein intramembrane particle of the human red blood cell.
Membrane transport in erythrocytes, Alfred Benzon Symposium 14, Editors:
Lassen, U.V., Ussing, H.H. and Wieth, J.O, Munksgaard, 35-50, Copenhagen 1980.

103. Grol, C.J., Dijkstra, D., Schunselaar, W., Westerink, B.H.C. and Martin, A.R.:
Synthesis and pharmacological evaluation of conformationally restricted phenothiazine analogues.
J.med. Chem. 25, 5-9 (1982).

104. Richards, C.D., Martin, K., Gregory, S., Keightley, C.A., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B. and Metcalfe,J.C.:
Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action.
Nature 276, 775-779 (1978).

105. Zimmerer, G. and Schulze, P.:
Membrane Action of Tricyclic Drugs.
Arzneim.-Forsch. / Drug Res. 31, (II) (1981).

106. Biesendorfer, H., Felix, W., Wildenauer, D.B.:
Studies on the haemolytic action of amphiphilic substances in vitro.
Biochem. Pharmacol. 30, (1981).

107. Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.:
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.
Biochemistry 10, 2606-2617 (1971).

108. Rouser, G. and Fleischer, S.:
Isolation characterization, and Determination of Polar Lipids of Mitochondria.
J. Amer Oil Chem. Soc. 42, 385-433 (1965).

109. Kates, M.:
Techniques of Lipidology:
Isolation, analysis and identification of lipids.
University of Ottawa, Canada, 275-601.

110. Warren, R.J., Eisdorfer, I.B., Thompson, W.E. and Zarembo, J.E.:
Spectra - structure correlations of phenothiazines by infrared, ultraviolet and nuclear magnetic resonance spectroscopy.
J. Pharmaceutical Sci. 2, 144-150 (1966).

111. Wildenauer, D.B. and Zeeb, B.C.:
Synthesis of phenothiazine derivatives with photoaffinity label and interaction with dopamine binding sites.
Advances in the biosciences 37, 153-156 (1982).
Advances in dopamine research (M. Kohsaka et al. Eds).
Pergamon Press, Oxford, New York.

112. Wildenauer, D.B.:
unveröffentlicht.

113. Wildenauer, D.B. and Zeeb-Wälde, B.C.:
Interactions of phenothiazine derivatives with the erythrocyte membrane in vitro as studied by photoaffinity labeling.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 321, R 66 (1982).

H. Lebenslauf

Am 3.2.1955 wurde ich, Beate Wälde geb. Zeeb, als Tochter des Apothekers Paul Zeeb und seiner Ehefrau Dr. Ruth Zeeb, Diplomchemikerin, in Göppingen geboren.

Von 1962 - 1966 besuchte ich die Grundschule und anschließend das Freihofgymnasium in Göppingen, an welchem ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Sommersemester 1975 bis zum Juli 1978 studierte ich am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen Pharmazie. Mit dem Staatsexamen am 24.10.1978 schloß ich das Studium ab.

Vom Oktober 1978 bis April 1979 arbeitete ich wissenschaftlich, als Teil meines einjährigen Praktikums, am Pharmakologischen Institut der Universität in München. Den zweiten Teil meines Praktikums absolvierte ich in der Hirsch-Apotheke in Göppingen (April 1979 - Oktober 1979). Die Approbation als Apotheker erhielt ich am 7. Januar 1980.

Im Januar 1980 begann ich am Pharmakologischen Institut der Universität in München mit meiner Doktorarbeit.